

**GUSTAVO RASSIER ISOLAN**

**RELAÇÃO ENTRE IMUNOMARCAÇÃO DAS PROTEÍNAS Ki-67 E p53 COM  
GRAU DE MALIGNIDADE E VARIANTE HISTOLÓGICA EM NEOPLASIAS  
ASTROCITÁRIAS**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em  
Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial  
à obtenção do Grau Acadêmico de Doutor.**

**Orientador: Prof. Dr. Jurandir Marcondes Ribas Filho  
Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias**

**CURITIBA**

**2004**

Isolan, Gustavo Rassier

Relação entre imunomarcção das proteínas Ki-67 e p53 com grau de malignidade e variante histológica em neoplasias astrocitárias / Gustavo Rassier Isolan. Curitiba, 2004.

xix p., 28cm, 84 f.

Orientador: Prof . Dr. Jurandir Marcondes Ribas Filho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica.

Anexos

Inclui bibliografia

1. Neoplasia astrocitária 2.p53 3.ki-67 4.imunohistoquímica. I. Título.

A meu pai, Augusto, exemplo de luta, honestidade e compaixão, cuja vida inteiramente dedicada aos filhos proporcionou a mim e meus irmãos uma formação ética e profissional que norteia nossas atitudes no auxílio ao próximo.

À minha mãe, Vera, exemplo de alegria e bondade, pelo carinho e proteção.

A meus irmãos, Luciano e Augusto, pela amizade que nos une.

A meus tios Iolanda, Floriano, Tomaz e Tânia Isolan, pela confiança constante depositada em minha pessoa, que foi fundamental no desenvolvimento de minha vida acadêmica e pessoal.

A meus futuros sogros, Jorge e Maria, pelo apoio constante e por terem me oferecido a oportunidade de conhecer o verdadeiro caminho.

À minha noiva, Paola, exemplo máximo de competência e amor para com os pacientes, seu idealismo despertou e sempre despertará em mim uma alegre fé e uma intensa confiança no ato de fazer o bem simplesmente por fazê-lo, por mais intensa que esteja sendo a luta diária. Nosso amor e nossa amizade dão-me a intuição de estar transcendendo diariamente o que acredito ser a relação mais completa entre duas pessoas.

A todos os meus familiares, pelo apoio constante.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Jurandir Marcondes Ribas Filho, orientador desta tese, profissional admirável pela sua competência e dedicação não somente para com a pós-graduação, mas para com toda a classe médica. Sua postura séria e empática tornou-se um sólido alicerce que norteia muitos dos meus atos como médico.

Ao Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, coordenador do Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de participar de excelente curso no nível de doutorado.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Malafaia, coordenador do Programa de Pós-graduação em Princípios da Cirurgia, pela oportunidade que me foi concedida para freqüentar e concluir um excelente curso no nível de mestrado, e pelos conselhos fundamentais para futura vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Allan Giovanini, pesquisador com admirável espírito científico que esteve profundamente envolvido em todas as etapas deste trabalho, demonstrando inestimável dedicação e profundos conhecimentos de patologia e imunohistoquímica.

Ao Serviço de Neurocirurgia do HUEC, na pessoa do Prof. Dr. Arthur Kummer Jr., exemplo de honestidade, bondade e empatia, por ter me oferecido excelente formação neuroética e neurocirúrgica.

Ao Serviço de Patologia do HUEC, na pessoa do médico patologista Prof. Dr. Acir Mulinari, pelo apoio e dedicação demonstrados durante a fase de coleta do material e análise histopatológica.

À médica patologista e especialista em genética médica Adriana Toneli, pelo importante auxílio na análise histopatológica.

À Profa. Dra. Lígia Coutinho, emérita neuropatologista, Coordenadora da Pós-graduação em Patologia Médica da FFFCMPA, pela contribuição em parte da revisão histopatológica.

Ao Prof. Dr. Evandro de Oliveira, renomado neurocirurgião, diretor do Instituto de Ciências Neurológicas de São Paulo e professor da UNICAMP, por seus ensinamentos e sua filosofia, que se tornaram para mim o principal alicerce do caminho para a prática neurocirúrgica de excelência

Aos profs. da Universidade Católica de Pelotas, Prof. Dr. Fernando Antônio de Oliveira Costa e Prof. Dr. Antônio de Jesus Vianna Pinho, neurocirurgiões, exemplos de competência profissional e influenciadores diretos em minha escolha na área de neurociência.

À Márcia Regina Inácio, bióloga , pelas excelentes idéias que muito ajudaram na escolha do tema a ser estudado e pelo auxílio na parte técnica referente ao Ki-67.

À Profa. Dra. Carmem Austrália Paredes Marcondes Ribas, pelas idéias e por estar sempre disposta a ajudar no que fosse preciso.

Aos alunos da graduação Ary Neto e Gisele Hayashi, da Universidade Federal do Paraná, e André Vidigal, da Faculdade Evangélica do Paraná, pelos esforços despendidos na coleta do material.

À Roberta Isolan, pela paciência e alegre desprendimento na busca de muitos dos artigos utilizados.

À bioestatística Cristina Dornelles, pelo importante auxílio na realização dos cálculos estatísticos.

À bibliotecária do Setor de Ciências da Saúde da UFPR Áurea Maria Costin, pela revisão da editoração.

À professora de língua portuguesa Maria Antônia Meister Martins Biazeto, pelo auxílio na revisão final do conteúdo gramatical.

Aos Funcionários do Serviço de Patologia do HUEC, pela dedicação no auxílio na coleta do material.

Ao grande amigo Prof. Dr. Marcelo Vettori, físico, pelos profundos esclarecimentos biofísicos e bioquímicos que regem os princípios da biologia molecular.

Ao Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e ao IPEM/HUEC/FEPAR, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Imunohistoquímica da UNICENP, por oferecer toda a estrutura necessária para realização da técnica imunohistoquímica empregada nesta pesquisa.

Aos amigos que sempre me deram apoio de maneira sincera e empática não somente no transcurso desta tese, mas desde que nos conhecemos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) pelo incentivo e apoio financeiro para a realização deste estudo.

A Deus, a quem tudo devo.

Pela ignorância, os sentidos nos mantêm na inconsciência da nossa escravidão.

Pela ciência, o intelecto nos torna conscientes da nossa escravidão.

Pela sapiência, a razão nos liberta da escravidão.

A verdade sobre Deus, a verdade sobre o mundo, a verdade sobre nós mesmos – eis a grande libertadora!

Conhecereis a verdade – e a verdade vos libertará...

A verdade, porém, só pode ser conhecida pela razão intuitiva, espiritual, pelo divino Logos que ilumina todo homem que vem a este mundo. Por isso, é a razão que, pelo conhecimento da verdade, nos traz a grande liberdade – a gloriosa liberdade dos filhos de Deus...

Baruch de Spinoza

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b>	x
<b>LISTA DE TABELAS</b>	xi
<b>LISTA DE QUADROS</b>	xii
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b>	xiii
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	xiv
<b>LISTA DE SIGLAS</b>	xv
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b>	xvii
<b>RESUMO</b>	xviii
<b>ABSTRACT</b>	xix
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	3
2.1 NEOPLASIAS ASTROCITÁRIAS	3
2.2 VARIANTE HISTOLÓGICA	3
2.3 GRADAÇÃO HISTOLÓGICA	5
2.4 O CICLO CELULAR	7
2.5 Ki-67	9
2.5.1 Ki-67 e Proliferação Celular	10
2.5.2 Estrutura e Funções	11
2.5.3 Ki-67, Imunohistoquímica e Astrocitomas	12
2.6 ASPECTOS GENÉTICOS DO CÂNCER	14
2.7 p53	15
2.7.1 Estrutura e Funções	15
2.7.2 p53 e as Vias de Parada do Ciclo Celular	16
2.7.3 p53 e as Vias de Apoptose	17
2.7.4 p53, Imunohistoquímica e Astrocitomas	17
2.8 Ki-67, p53 E ASTROCITOMAS	21
2.9 IDADE E SEXO	24



<b>3. PACIENTES E MÉTODOS</b>	25
3.1 AMOSTRA E SELEÇÃO	25
3.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO	25
3.3 HISTOLOGIA	26
3.3.1 Processamento Histológico	26
3.3.2 Avaliação Histológica	26
3.4 IMUNOHISTOQUÍMICA	32
3.4.1 Procedimento Imunohistoquímico	32
3.4.2 Anticorpos para antígenos Ki-67 e p53	33
3.4.3 Análise Quantitativa da Expressão do Ki-67 e p53	33
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
<b>4 RESULTADOS</b>	37
4.1 RESULTADOS IMUNOHISTOQUÍMICOS	37
4.1.1 Ki-67	37
4.1.2 p53	38
4.2 GRAU HISTOLÓGICO E Ki-67	39
4.3 VARIANTE HISTOLÓGICA E Ki-67	41
4.4 GRAU HISTOLÓGICO E p53	43
4.5 VARIANTE HISTOLÓGICA E p53	45
4.6 Ki-67 e p53	46
4.7 IDADE E SEXO	49
4.8 RESULTADO DA DISTRIBUIÇÃO GERAL DOS DADOS COMPUTADOS	50
<b>5 DISCUSSÃO</b>	51
5.1 Ki-67 E IMUNOHISTOQUÍMICA	52
5.2 p53 E IMUNOHISTOQUÍMICA	53
5.3 DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO	55
5.4 GRAU HISTOLÓGICO E Ki-67	56
5.5 GRAU HISTOLÓGICO E p53	57

5.6 VARIANTE HISTOLÓGICA E Ki-67 .....	62
5.7 VARIANTE HISTOLÓGICA E p53.....	63
5.8 Ki-67 E p53 .....	65
5.9 IDADE E SEXO .....	67
5.10 NOVAS PERSPECTIVAS .....	69
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO .....</b>	<b>82</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>83</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – O CICLO CELULAR .....	9
FIGURA 2 – NEOPLASIA ASTROCITÁRIA GRAU II .....	27
FIGURA 3 - NEOPLASIA ASTROCITÁRIA GRAU III .....	27
FIGURA 4 – NEOPLASIA ASTROCITÁRIA GRAU IV.....	28
FIGURA 5 – NEOPLASIA ASTROCITÁRIA GRAU IV.....	28
FIGURA 6 – NEOPLASIA ASTROCITÁRIA GEMISTOCÍTICA.....	30
FIGURA 7 – NEOPLASIA ASTROCITÁRIA PILOCÍTICA .....	30
FIGURA 8 – MATERIAL DE ANÁLISE DAS LÂMINAS.....	34
FIGURA 9 – Ki-67 EM NEOPLASIA ASTROCITÁRIA GRAU IV .....	42
FIGURA 10 – Ki-67 EM NEOPLASIA ASTROCITÁRIA GRAU IV.....	42
FIGURA 11 – p53 EM NEOPLASIA ASTROCITÁRIA GRAU IV.....	44
FIGURA 12 – p53 EM NEOPLASIA ASTROCITÁRIA GRAU III.....	45

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VARIÁVEIS ESTUDADAS E MEDIDAS DESCRITIVAS (1997-2001).....	37
TABELA 2 – CORRELAÇÃO DAS VARIÁVEIS, ATRAVÉS DO TESTE DE WILCOXON-MANN-WHITNEY ENTRE OS PACIENTES COM p53 E SEM p53 (1997-2001).....	48
TABELA 3 – CORRELAÇÃO DAS VARIÁVEIS, ATRAVÉS DO TESTE DE WILCOXON-MANN-WHITNEY ENTRE OS PACIENTES COM KI-67 E SEM Ki-67 (1997-2001).....	48
TABELA 4 – RELAÇÃO ENTRE p53 E IDADE .....	49
TABELA 5 – RELAÇÃO ENTRE p53 E SEXO.....	49
TABELA 6 – RELAÇÃO ENTRE Ki-67 E IDADE .....	49
TABELA 7 – RELAÇÃO ENTRE Ki-67 E SEXO .....	50
TABELA 8 – PREDITORES DA p53 EM MODELO DE REGRESSÃO LOGÍSTICA (RL) 1997/2001 .....	83
TABELA 9 – PREDITORES DO Ki-67 EM MODELO DE REGRESSÃO LOGÍSTICA (RL) 1997/2001 .....	83
TABELA 10 – RESULTADOS DA DISTRIBUIÇÃO GERAL DOS DADOS COMPUTADOS .....	84

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES.....	7
QUADRO 2 - DESCRIÇÃO DA AMOSTRA DE 47 NEOPLASIAS ASTROCITÁRIAS (1997/2001).....	31

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – DISTRIBUIÇÃO DO Ki-67 NA POPULAÇÃO ESTUDADA .....	38
GRÁFICO 2 – DISTRIBUIÇÃO DA p53 NA POPULAÇÃO ESTUDADA .....	39
GRÁFICO 3 – RELAÇÃO ENTRE Ki-67 E GRAU HISTOLÓGICO .....	40
GRÁFICO 4 – CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE Ki-67 E GRAU HISTOLÓGICO ...	40
GRÁFICO 5 – RELAÇÃO DA Ki-67 E VARIANTE HISTOLÓGICA .....	41
GRÁFICO 6 – RELAÇÃO ENTRE GRAU HISTOLÓGICO E IMUNOMARCAÇÃO p53.....	43
GRÁFICO 7 – CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE p53 E GRAU HISTOLÓGICO .....	44
GRÁFICO 8 – RELAÇÃO ENTRE p53 E VARIANTE HISTOLÓGICA .....	46
GRÁFICO 9 – RELAÇÃO ENTRE Ki-67 E p53 .....	46
GRÁFICO 10 – CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE Ki-67 E p53 .....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

CDK – *Cyclin Dependent Kinase* / Proteína Quinase Dependente de Ciclina

EDTA – Ácido Etileno-diaminotetracético

EGF – *Epithelial Growth Factor* / Fator de Crescimento Epidérmico

EGFR – *Epithelial Growth Factor Receptor* / Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

GBM – Glioblastoma Multiforme

FISH – *Fluorescence in situ Hybridization* / Hibridização *in situ* com Sondas Conjugadas à Fluoresceína

H/E – Hematoxilina e Eosina

HUEC – Hospital Universitário Evangélico de Curitiba

IAG – Índice de Astrócitos Gemistocíticos

LOH – *Loss of Heterozygosity* / Perda da Heterozigose

MDM-2 – Oncogene *Murine Double Minute 2*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCNA – *Proliferating Cell Nuclear antigen* / Antígeno Nuclear de Proliferação Celular

PCR – *Polymerase Chain Reaction* / Reação em Cadeia de Polimerase

PDGF – *Platelet-derived Growth Factor* / Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas

SNC – Sistema Nervoso Central

## LISTA DE SIGLAS

*Bax* – gene da família do *bcl-2*, indutor de apoptose  
*Bcl-2* – *b cell lymphoma*/ refere-se à proteína *bcl-2*  
CDK4/ciclina – complexo oncogênico  
CM1 – anticorpo policlonal  
C19 – anticorpo policlonal  
DCC – gene supressor de tumor localizado no 18q  
Fas/APO1 – gene indutor da apoptose  
Gadd 45 – proteína envolvida no reparo do DNA  
G0 – estado de parada do ciclo celular  
G1 – “*gap1*”/ intervalo delimitante entre mitose e síntese de DNA  
G2 – “*gap2*”/ intervalo após a síntese do DNA e antes da mitose  
DR5 – proteína que refere-se ao gene do mesmo nome  
IGFBP3 – fator de crescimento insulina-símile  
IGF-1 – fator de crescimento semelhante a pró-insulina  
IgG2b – isótopo humano da p53  
MIB-1 – anticorpo monoclonal contra antígeno Ki-67  
NC-MM1 – anticorpo monoclonal contra antígeno Ki-67  
NC-Ki-67p – anticorpo policlonal contra o antígeno Ki-67  
p15 - proteína de 15 kilodaltons  
p16 - proteína de 16 kilodaltons  
p21 – proteína de 21 kilodaltons pertencente a família *Cip*  
p53 – refere-se ao gene ou proteína p53  
Pab240 – anticorpo monoclonal  
Pab 421 – anticorpo monoclonal  
Pab1801 – anticorpo contra a proteína p53  
PTEN – gene supressor de tumor localizado no 10q23.3



rahKi-67 – anticorpo policlonal contra o Ki-67

TUBB-9 – anticorpo monoclonal contra Ki-67

Waf1/Cip1 – “wild type p53 activated fragment one”/”ciclin inhibitory protein”

## LISTA DE SÍMBOLOS

C – carbono, refere-se também a porção carboxil-terminal

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – dióxido de dihidrogênio (água oxigenada)

kD – kilo daltons – unidade de peso molecular

M – unidade de concentração molar

mM – unidade de concentração milimolar

N – nitrogênio, refere-se também a porção amino-terminal

## RESUMO

**Introdução.** As neoplasias astrocitárias correspondem a 60% dos tumores do sistema nervoso central, sendo o estudo da biologia molecular um importante passo para a compreensão da gênese e comportamento biológico destas doenças. As proteínas Ki-67, que é um marcador de proliferação celular, e p53, que é o produto do gene supressor de tumor de mesmo nome, são importantes marcadores tumorais. Os objetivos deste estudo foram identificar e quantificar as proteínas Ki-67 e p53 em diferentes graus de malignidade e variantes histológicas das neoplasias astrocitárias, bem como analisar suas relações com idade e sexo. **Pacientes e métodos.** Foram estudadas por imunohistoquímica as proteínas Ki-67 (Clone MIB-1, DAKO) e p53 (Clone DO-7, DAKO) em 47 pacientes com neoplasias astrocitárias ressecadas cirurgicamente entre 1997 e 2001 classificadas previamente e revisadas quanto ao grau de malignidade, de acordo com o proposto pela Organização Mundial da Saúde, e a variante histológica. Os núcleos celulares imunomarcados foram quantificados no programa Imagelab-softium pela razão paramétrica absoluta entre os núcleos de células positivas e o número total de células tumorais, sendo contadas 1000 células. O delineamento utilizado foi transversal não controlado. Para análise estatística as variáveis foram divididas em grupos, que para a Ki-67 foram ausente, <5% e >5% e para a p53 foram ausente (0), <25% (1+), entre 25 e 50% (2+), entre 50 e 75% (3+) e maior que 75% (4+). **Resultados.** Ki-67 esteve presente em 37 casos (78,72%) expressando correlação com maior grau de malignidade ( $P<0,001$ ) e com as variantes histológicas fibrilar e gemistocítica ( $P=0,02$ ). A p53 esteve presente em 13 casos (35,13%) tendo maior correlação com astrocitoma grau IV ( $P=0,59$ ) e variante gemistocítica ( $P=0,42$ ). Não houve correlação estatisticamente significativa entre p53 e Ki-67, bem como entre estas variáveis, idade e sexo. **Conclusão:** a hipótese de maior presença de Ki-67 e p53 em neoplasias astrocitárias de maior grau de malignidade e variante histológica gemistocítica, com exceção da correlação entre grau III e p53, é corroborada pelos resultados deste estudo.

Palavras-chave: astrocitoma, p53, Ki-67

## ABSTRACT

**Introduction.** The astrocytic neoplasms answer for 60% of the Central Nervous System tumors, being the study of the molecular biology an important step for the understanding of the genesis and biological behavior of these diseases. The Ki-67 proteins, which are markers of the cellular proliferation, and p53, which is the product of the suppressing gene of the tumor named after it, are both important tumoral markers. This study intends to identify and quantify the Ki-67 and p53 proteins in different malignancy graus and the histologic variances of the astrocyte neoplasias, as well as to analyze their relations with age and gender. **Patients and methods.** Ki-67 (Clone MIB-1, DAKO) and p53 (Clone DO-7, DAKO) proteins in 47 patients with surgically resected astrocytic neoplasms were studied through immunohistochemistry between 1997 and 2001. They have been previously classified and reviewed concerning their malignancy, and histologic variance, as suggested by the World Health Organization. The immunomarked cellular nuclei were quantified by the program Imagelab-softium for the absolute parametric reason between the nuclei of the positive cells and the total amount of tumoral cells, being counted 1000 cells. The lineation used has been transversal not controlled. For the statistical analysis the variables were divided into groups. For the Ki-67 they were absent, <5% and >5% and for p53 they were absent (0), <25% (1+), between 25 and 50% (2+), between 50 and 75% (3+), and higher than 75% (4+). **Results.** Ki-67 was present in 37 cases (78.72%) evidencing a correlation with a higher malignancy degree ( $P<0,001$ ) and with the fibrilar and gemistocytic histologic variance ( $P=0.02$ ). p53 was present in 13 cases (35.13%) with a higher correlation with astrocytoma grau IV ( $P=0.59$ ) and gemistocytic variance ( $P=0.42$ ). There has not been a statistically significant correlation between p53 and Ki-67, as well as among these variances, age and gender. **Conclusion:** the hypotheses of a greater presence of Ki-67 and p53 in astrocytic neoplasms with a higher degree of malignancy and gemistocytic histologic variance, except for the correlation between grau III and p53, is corroborated by the results of this study.

Key words: astrocytoma, p53, Ki-67

## 1 INTRODUÇÃO

O termo “tumor cerebral” refere-se a um grande grupo de neoplasias que têm aspecto biológico, tratamento e prognóstico próprios. O tratamento de cada uma delas depende da localização do tumor e das condições clínicas do paciente, dentre outros fatores, podendo ser cirúrgico, quimioterápico ou radioterápico.

A sobrevida média dos pacientes com os tumores cerebrais varia de oito a dez anos nos astrocitomas de baixo grau de malignidade até menos de um ano no glioblastoma multiforme (GBM) (DE ANGELIS, 2001; SHIRAISHI, 2002).

A maioria dos tumores cerebrais comporta-se como “neoplasias intracranianas”, contudo, há tumores que não se originam do tecido cerebral, dentre os quais os meningiomas e linfomas (DE ANGELIS, 2001).

O conhecimento da biologia molecular celular inicia no estudo do ciclo da célula, que consiste de uma complexa cadeia de eventos metabólicos dividida academicamente em quatro fases e cujo objetivo final é a duplicação desta. O grau em que uma célula se prolifera tem forte correlação nas neoplasias com a intensidade da carcinogênese. Dessa maneira, o estudo de marcadores de proliferação celular torna-se um importante coadjuvante na pesquisa do câncer.

Em relação aos marcadores de proliferação celular, o antígeno Ki-67 é considerado, atualmente, o de maior acurácia, sendo analisado em diversos tipos de neoplasias, dentre estas as do sistema nervoso central. Identifica-se a presença deste antígeno em tumores emblocados em parafina mediante reação do antígeno com o anticorpo MIB-1.

Dentre as neoplasias com verdadeira histogênese cerebral, as astrocitárias compreendem aproximadamente 60% dos tumores cerebrais primários dos adultos, tendo predominância no sexo masculino. Quanto à idade, varia entre as diversas gradações histológicas, sendo que a maioria dos casos considerados de alto grau acometem pacientes entre a sexta e sétima décadas de vida, enquanto os de baixo

grau são mais comuns em pacientes de meia idade (KLEIHUES; CAVENEE, 2000; DE ANGELIS, 2001).

A etiologia dos astrocitomas é desconhecida. Todavia, fatores genéticos hereditários, como Síndrome de Turcot, Doença de Ollier, Síndrome de Mafucci, ou mesmo fatores externos como a radiação ionizante são responsáveis por casos esporádicos. Corroborando estas observações, tem sido relacionada a mutação genética como fator principal e desencadeante das neoplasias astrocitárias, dentre as quais a do gene supressor de tumor p53.

O gene supressor de tumor p53 sintetiza uma proteína de mesmo nome, que tem importância fundamental na regulação do ciclo celular e apoptose, mas, quando mutada, está associada a diversos graus de comportamento neoplásico. A técnica de imunohistoquímica consiste na identificação mediante reação antígeno-anticorpo da proteína p53 mutada no núcleo da célula.

Este trabalho estabeleceu a presença das proteínas Ki-67 e p53 mediante a técnica de imunohistoquímica em 47 neoplasias astrocitárias de diferentes graus e variantes histológicas, sendo o objetivo correlacionar as seguintes variáveis:

1. Ki-67 com grau de malignidade.
2. p53 com grau de malignidade.
3. Ki-67 com variante histológica.
4. p53 com variante histológica.
5. p53 com Ki-67.
6. Ki-67 e p53 com idade e sexo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 NEOPLASIAS ASTROCITÁRIAS

Dentre as neoplasias astrocitárias, os astrocitomas compreendem 60% dos tumores primários do Sistema Nervoso Central (SNC). São neoplasias infiltrativas compostas por astrócitos, que podem apresentar diferentes graus de malignidade, proporcionais a seu grau de atipia (KIM et al., 1991; BURGER; SCHEITHAUER, 1994; HERMANSON et al., 1996). De acordo com a prevalência do componente celular, a chamada variante histológica, podem ser divididos em três grupos (fibrilar, gemistocítico e protoplasmático), entretanto, uma classificação clara e precisa nem sempre é possível (KLEIHUES; CAVENEE, 2000; MARTINS et al., 2001). Além destes, existe um quarto grupo classificado separadamente devido ao comportamento biológico menos agressivo, o bom prognóstico e à freqüente presença de estruturas císticas. Deste grupo fazem parte o astrocitoma pilocítico, o xantoastrocitoma pleomórfico e o astrocitoma subependimário de células gigantes.

### 2.2 VARIANTE HISTOLÓGICA

A variante histológica mais freqüente dos astrocitomas é a de tipo fibrilar. Esta neoplasia freqüentemente exhibe padrão estrutural microcístico, contudo, em raras ocasiões, pode-se verificar a presença de um estroma neoplásico condro-símile. Os astrócitos fibrilares que compõem esta neoplasia possuem escasso citoplasma com densidade cromática variada e núcleos amplos, exibindo atipia discreta a moderada (MATHEWS et al., 1974; KEPES; RUBINSTEIN; CHIANG, 1984).

O segundo grupo de astrócitos é o gemistocítico, cuja característica histológica predominante é a presença de células grandes contendo citoplasma

irregular e eosinofílico (KROUWER et al., 1991). Devido a essas células poderem ser encontradas nas outras variantes histológicas, MARTINS et al. (2001) propuseram que o critério de se classificar um astrocitoma como tipo gemistocítico deve-se a um percentual de pelo menos 20% de células gemistocíticas. Estes tumores geralmente estão associados à presença de um infiltrado linfocitário perivascular (COTRAN; KUMMAR; COLLINS, 1999).

O último grupo, mais raro, compreende os astrócitos protoplasmáticos, células de pequeno corpo celular e núcleo ovóide, geralmente, acompanhadas de degeneração mucóide e característicos espaços microcísticos (KLEIHUES; CAVENEE, 2000).

Os astrócitos pilocíticos, células bipolares com prolongamentos longos e finos, são um grupo celular especial pelo prognóstico favorável que representam (COTRAN; KUMAR; COLINS, 1999). Outro grupo, cuja evolução clínica é semelhante, é o que possui os componentes celulares que caracterizam o xantastrocitoma pleomórfico, os quais, como o nome indica, são células de vários formatos e muitas vezes com vários núcleos associadas às células gordurosas xantomatosas. O terceiro tipo neoplásico é o astrocitoma subependimário de células gigantes, composto pela associação de calcificações, grandes células multinucleadas e raras mitoses.

Os diferentes tipos celulares de neoplasias astrocitárias parecem não constituir somente morfologias e padrões estruturais variados, como também relações clínicas muitas vezes opostas. BURGER e SCHEITHAUER (1994) relataram que, dentre os astrocitomas fibrilares dos hemisférios cerebrais, existe relação direta entre o grau histológico e a idade do paciente, estado clínico e sobrevida pós-tratamento. Embora tais tumores sejam propensos a aumentar seu grau de malignidade, esse fenômeno é mais freqüente nos astrocitomas gemistocíticos, conforme o trabalho de KROUWER et al. (1991), que avaliou esta progressão em estudos histopatológicos iniciais comparados aos tardios no curso da progressão ou recidiva tumoral.



## 2.3 GRADAÇÃO HISTOLÓGICA

A gradação dos astrocitomas representa uma tentativa acadêmica de estabelecer critérios de divisão neoplásica, visto que a heterogeneidade do componente celular neoplásico, através de cortes seriados, pode demonstrar diferentes condições histopatológicas dentro de um mesmo tumor (STEILEN-GIMBEL et al., 1999).

NELSON et al. (1983), DAUMAS-DUPORT, SCHEITHAUER e KELLY (1987) e SCHIFFER et al. (1988) descreveram que a presença de um padrão microcístico e de componentes bem diferenciados são fatores prognósticos favoráveis para os astrocitomas fibrilares. Por outro lado, atipias celulares, atividade mitótica, hiperplasia vascular e necrose são desfavoráveis (KIM et al., 1991; PERRY et al., 1999).

Visando obter a compreensão da atual classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), far-se-á um breve histórico das classificações prévias. Uma primeira classificação, realizada por Bailey e Cushing, baseou-se na similaridade superficial das células neoplásicas dividindo-as em três estágios de citogênese glial: astrocitoma, astroblastoma e espongiblastoma multiforme, conforme o grau ascendente de malignidade. Apesar desta classificação ter obtido aceitação entre os patologistas, KERNOHAN et al.<sup>1</sup> (1949), citado por LITOFISKY e RECHT (1997), seguindo os padrões de classificações neoplásicas de outros tecidos, ao subdividir os astrocitomas em graus de 1 a 4, verificou estreita relação entre a gradação tumoral, idade e sobrevida. Entretanto, nos astrocitomas grau 1, estavam incluídos tanto os fibrilares quanto os pilocíticos, duas lesões com comportamento biológico e prognóstico diferentes. Além disso, a classificação igualava as variantes mais malignas, não tendo critérios claros para diferenciá-las (KERNOHAN et al.<sup>1</sup>, 1949, citado por LITOFISKY; RECHT, 1997; BURGER; SCHEITHAUER, 1994).

1. KERNOHAN et al. A simplified classification of gliomas. **Proc Staff Meet Mayo Clinic**, Rochester, n. 24, p. 71-75, 1949.

Em 1950, surgiu o Sistema de Ringertz, substituindo os números, como na grau de Kernohan, por letras, e colocando todos os GBMs em um grau de malignidade. Desta forma, os astrocitomas fibrilares foram subdivididos em astrocitoma, lesão intermediária e GBM. Os astrocitomas eram bem diferenciados com raras mitoses e sem proliferação vascular. A lesão intermediária, embora mais celular e mitoticamente ativa, não evidenciava proliferação vascular e necrose. O GBM apresentava-se pleomórfico, mitoticamente ativo e exibia proliferação vascular e necrose. Como no grau de Kernohan e numerosas classificações subseqüentes, diferenças significantes em termos de prognóstico foram observadas entre pacientes de uma mesma grau (BURGER; SCHEITHAUER, 1994).

A OMS, em 1993, utilizando algarismos romanos antes de numerais arábicos, empregou uma classificação similar ao esquema de Ringertz, sendo o astrocitoma difuso bem diferenciado considerado grau II, a lesão intermediária ou Astrocitoma Anaplásico (maligno), grau III, e o GBM, grau IV. O grau I ficou reservada para astrocitomas pilocíticos e um pequeno número de lesões de baixo grau de malignidade (KLEIHUES; CAVENEE, 2000).

A classificação mais recentemente introduzida é o sistema de graduação St. Anne-Mayo para astrocitomas do tipo fibrilar, que os classifica em quatro graus com base na seqüência da presença ou ausência das seguintes variáveis: atipia nuclear, mitoses, proliferação vascular e necrose. Tumores destituídos destes critérios são classificados como grau I. Demonstrando uma única variável, grau II. Duas variáveis, grau III e três ou quatro variáveis, grau IV. Esse sistema simplificado tem fácil aplicação e boa correlação prognóstica (KIM et al., 1991), entretanto, pode ser aplicado somente a tumores invasivos de linhagem astrocitária, ficando excluído, conseqüentemente, o astrocitoma pilocítico (TATTER, 2003).

O sistema da OMS, atualmente, é o mais amplamente aceito porque oferece, além de um sistema de gradação para cada tipo de tumor dentro da sua classificação geral, boa correlação prognóstica e padronização de comunicação entre diferentes centros (KLEIHUES; BURGER; SCHEITHAUER, 1993; TATTER, 2003). O quadro 1 compara as classificações.

QUADRO 1 - COMPARAÇÃO ENTRE AS DIFERENTES CLASSIFICAÇÕES

Grau OMS	Designação OMS	St Anne/Mayo	
		Designação	Crítérios histológicos
I	Astrocitoma pilocítico		
II	Astrocitoma (baixo grau)	Astrocitoma grau 1	Nenhum critério
		Astrocitoma grau 2	Um critério
III	Astrocitoma anaplásico	Astrocitoma grau 3	Dois critérios
IV	Glioblastoma multiforme	Astrocitoma grau 4	Três critérios

FONTE: baseado no quadro de BURGER, P.C. e SCHEITHAUER, B.W. Fascicle 10 - Tumors of the central nervous system. In: \_\_\_\_\_. **Atlas of tumor pathology**. Washington, D.C. Armed Forces Institute of Pathology, 1994.

## 2.4 O CICLO CELULAR

O ciclo celular é definido como a alternância de mitose e intérfase e é composto por duas fases funcionais (fase S ou síntese e fase M ou mitose) e duas fases preparatórias (G1 e G2) (BRENTANI et al., 1998; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 1999).

O maior tempo da vida de uma célula é na intérfase, que corresponde a 90% do tempo total do ciclo celular. Esta tem início imediatamente após a mitose, quando a célula entra numa fase em que não há síntese de DNA. Essa fase inicial chama-se G1 e nela ocorre síntese de RNA e proteínas. A seguir inicia a duplicação do DNA, correspondente a fase S, na qual cada cromossomo se duplica, ficando com duas cromátides. A etapa seguinte é a fase G2, que consiste na preparação celular para a mitose. Esta fase tem término com o início da mitose. A mitose, por sua vez, é dividida em seis fases, que iniciam com a condensação dos cromossomos e terminam com a descondensação destes com subsequente origem de duas células-filhas. Academicamente, a seqüência de eventos na mitose é dividida em prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase (BRENTANI et al., 1998; COTRAN;

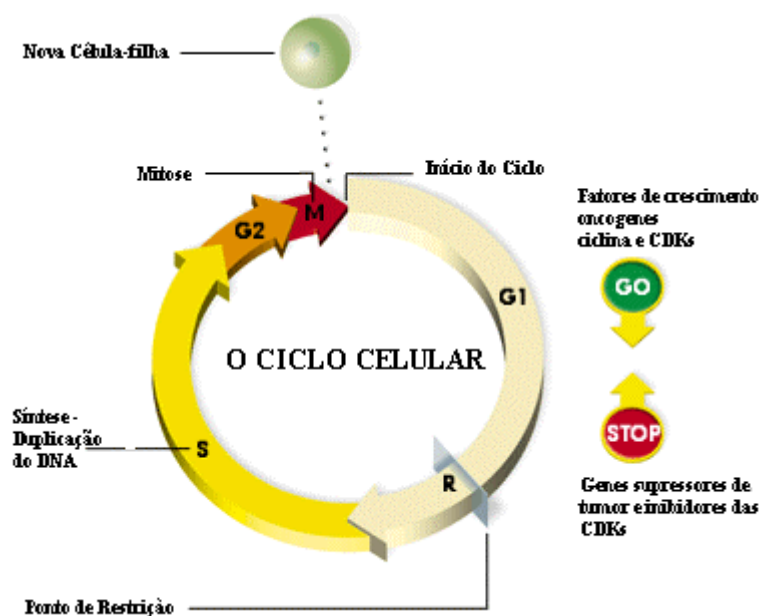
KUMAR; COLLINS, 1999). Por outro lado, a célula que não irá se duplicar entra na fase intitulada G0 (figura 1).

Um fator crucial dos complexos eventos bioquímicos da célula diz respeito ao fato de a maior variação de tempo no ciclo celular ser em G1, porque nesta fase existe um ponto específico denominado ponto de restrição. A importância deste local reside no fato de que, ultrapassando-o, o ciclo celular torna-se independente de estímulos mitogênicos (BRENTANI et al., 1998).

O controle do ciclo celular é dado por sinais mitogênicos oriundos do meio ambiente, que são introduzidos por fatores de crescimento, tais como Fator de Crescimento Epitelial (EGF) e Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF). Tendo recebido estes sinais via receptores de membrana, a célula usa uma maquinaria intracelular complexa para transduzi-los e iniciar sua divisão. Para entrar em um ciclo celular de divisão, as células recrutam um grupo de proteínas regulatórias e enzimas. As enzimas-chaves são as Quinases Dependentes da Ciclina (CDKs), assim chamadas pelo fato de suas concentrações subirem e descerem durante o ciclo, sendo reguladas especificamente por proteínas da família das ciclinas. A expressão das ciclinas e sua associação às CDKs permite que as células passem através do ponto de restrição (BRENTANI et al., 1998; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 1999; KLEIHUES ; CAVENEE, 2000).

O inibidor universal da CDK é a proteína p21, cuja expressão gênica é regulada pela proteína p53. A proteína p21 inibe também o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), exercendo, dessa forma, um papel inibitório duplo. Outras proteínas que inibem especificamente as ciclinas são p15, p16 e p27 (BRENTANI et al., 1998; KLEIHUES; CAVENEE, 2000).

FIGURA 1 - O CICLO CELULAR



FONTE: Baseada na ilustração de George Eade. Disponível no site: <[http:// www.geocities.com](http://www.geocities.com)> Acesso em 14/10/2003.

## 2.5 Ki-67

A expressão da proteína Ki-67, no humano, é estritamente associada com a proliferação celular, sendo essa detectada nas fases G1, S, G2 e mitose. Dessa maneira, o Ki-67 é um excelente marcador para células em proliferação. Além disso, apresenta biologia peculiar, não tendo semelhança com nenhuma das outras proteínas envolvidas no ciclo celular.

### 2.5.1 Ki-67 e Proliferação Celular

Os aspectos do Ki-67 na proliferação celular devem ser precedidos de uma conceituação teórica a respeito do que seja, realmente, um marcador de proliferação. VAN DIERENDONCK et al. (1989) postularam dois critérios necessários para esta definição, que são a presença contínua do antígeno durante o ciclo celular em todos os tipos de células, e o desaparecimento deste quando a célula passa para um estado não proliferativo.

Em relação a estes critérios, o Ki-67 encontra-se presente em todas as fases do ciclo celular, com exceção de G0, e em todos os tipos de células com capacidade proliferativa. Quanto ao segundo critério, entretanto, existem certas dificuldades na conceituação teórica em definir o que seja uma célula não proliferativa, pois o tempo entre as mitoses pode variar consideravelmente, dependendo das condições do meio extracelular, tanto *in vivo* como *in vitro*. Dessa forma, o marcador será detectado sem a célula de fato encontrar-se em proliferação. No que tange a um outro aspecto, o termo marcador de proliferação está se referindo somente ao potencial da célula de se dividir, e não ao evento final da divisão celular, pois em um tumor que expresse células imunopositivas para Ki-67, essas podem não se duplicarem quando submetidas, por exemplo, à quimioterapia, permanecendo a imunomarcação (VAN OIJEN et al., 1988). Independentemente destes exemplos, é inquestionável que a expressão da proteína Ki-67 e a proliferação celular estão estritamente relacionadas. (SCHOLZEN; GERDES, 2000).

Em outras palavras, Ki-67 é, teoricamente, um parâmetro do estado fisiológico da célula, porém, não da sua capacidade de proliferação, pois não fornece informações relativas ao tempo necessário entre as mitoses. Isso se explica pela complexidade dos fatores que atuam no ciclo de uma célula, tanto internos (produtos de genes supressores de tumor, entre outros) quanto externos (quimioterapia, entre outros). Apesar de todas estas considerações, o Ki-67 é considerado o melhor marcador de proliferação, atualmente, porque foi encontrada forte correlação entre este e o prognóstico de diversos tumores (SCHOLZEN; GERDES, 2000).

Em relação à detecção do Ki-67, o maior empecilho para os estudos referentes a esta proteína era a incapacidade do anticorpo original detectar materiais emblocados em parafina. Este fato foi superado com o surgimento do anticorpo monoclonal MIB-1, que tem mais sensibilidade e facilidade metodológica, quando comparado à contagem do número de células em mitose (índice mitótico), e mais especificidade, quando comparado com o PCNA. Este último, de acordo com PROSPERI (1997), não é recomendado como marcador de proliferação celular porque se apresenta positivo mesmo em células em G0.

Em suma, Ki-67 é considerado o marcador de proliferação celular de maior acurácia, sendo utilizado muitas vezes como fator prognóstico em tumores cuja evolução é de difícil previsão quando baseada somente em critérios histológicos (SCHOLZEN; GERDES, 2000).

#### 2.5.2 Estrutura e Funções

O gene Ki-67 atua na síntese de duas isoformas da proteína Ki-67, uma com 320 kD e outra com 359 kD, relacionadas com a presença ou a ausência, respectivamente, do *exon 7* deste gene. Até a presente data, nenhuma outra proteína exibiu similaridade com o Ki-67.

Apesar de recentes estudos relacionarem a proteína Ki-67 com fenômenos de fosforilação e transporte nuclear, sua função permanece desconhecida. Atualmente, tem sido sugerido que Ki-67 tem um papel crucial na proliferação celular porque a injeção de anticorpos contra este antígeno tem diminuído a taxa de divisão celular (STARBORG et al., 1996; SCHOLZEN; GERDES, 2000; KAUSCH et al., 2003).

Em relação à expressão da proteína Ki-67 dentro do ciclo celular, GERDES et al. (1984), analisando detalhadamente a estimulação do ciclo celular de leucócitos sangüíneos mononucleares pela fitohemaglutinina, verificou que o antígeno Ki-67 estava presente no final da fase G1 e durante o período total das fases S, G2 e M, estando ausente na fase G0. Alguns autores (LOPEZ et al., 1991; BRUNO; DARZYNKIEWICZ, 1992), entretanto, discordam quanto à presença do Ki-67 em G1.

Essa discrepância pode ser esclarecida parcialmente pela hipótese de DU MANOIR et al. (1991), na qual são propostas três diferentes vias em G1. Em uma primeira há diminuição da proteína ki-67 e a célula, provavelmente, entrará em G0; em uma segunda, sendo a célula estimulada por fatores de crescimento, haverá um aumento do Ki-67 e a célula entrará na fase S. Na última, o Ki-67 encontra-se estável, exibindo intensidade constante durante G1, correspondendo a ótimas condições de proliferação celular.

Em relação à intensidade da presença do Ki-67 nas diferentes fases do ciclo celular, ela aumenta durante as fases S e G2, adquirindo máxima intensidade na metáfase e começando a diminuir na telófase. Essas observações são sugestivas do período de atuação do Ki-67 no ciclo celular (DU MANOIR et al., 1991; BRUNO; DARZYNKIEWICZ, 1992; STARBORG et al., 1996). Em relação à meia-vida, a da proteína Ki-67 é de, aproximadamente, 90 minutos (HEIDEBRECHT et al., 1996).

A localização do Ki-67 no ciclo celular depende da fase em que este se encontra, estando presente como numerosos focos no núcleo celular durante G1, no nucléolo durante S e G2, na superfície dos cromossomos durante a metáfase e distribuída difusamente no citoplasma após a quebra da membrana nuclear. (DU MANOIR et al., 1991; STARBORG et al., 1996; KILL, 1996). Entretanto, outros autores (BRAUN; PAPADOPOULUS; MÜLLER-HERMELINK, 1988; VAN DIERENDONCK et al., 1989) encontraram Ki-67 no citoplasma durante a fase S. Estas discrepâncias podem ser devido aos diferentes protocolos de fixação e técnica imunohistoquímica, bem como aos diferentes tipos celulares utilizados nestes estudos (SCHOLZEN; GERDES, 2000).

### 2.5.3 Ki-67, Imunohistoquímica e Astrocitomas

ZUBER, HAMOU e DE TRIBOLET (1988) analisaram o Ki-67 com anticorpo monoclonal em 51 gliomas e estabeleceram a média do número de células em cinco campos, sendo o resultado de células imunomarcadas entre 0% e 4,5% nos 16 astrocitomas de baixo grau, entre 0,7% e 7,4% nos oito astrocitomas anaplásicos e



entre 1,7% e 32,2% nos 27 GBMs. Concluíram que há relação entre grau de malignidade e Ki-67.

MONTINE et al. (1994) analisaram 36 pacientes com neoplasias astrocitárias e encontraram relação entre o maior grau de malignidade e imunorreatividade do Ki-67. O antígeno estudado também foi relacionado com pior prognóstico.

WAKIMOTO et al. (1996) estudaram a proteína Ki-67 com o anticorpo MIB-1 em 72 astrocitomas supratentoriais, sendo que a imunomarcção foi presente em 3,8% das células dos 19 gliomas grau II, 18,4% dos 25 gliomas grau III e 31,6% dos 28 glioblastomas. Houve também correlação entre Ki-67 e pior prognóstico.

McKEEVER et al. (1998) dividiram uma amostra de pacientes com astrocitomas grau II em índice de proliferação celular menor ou igual a 2% (22 pacientes) e maior que 2% (28 pacientes), utilizando o anticorpo MIB-1, sendo verificado pior prognóstico nos pacientes do segundo grupo.

TORP (2002) estudou 41 neoplasias astrocitárias distribuídas em 22 astrocitomas grau II fibrilares, dez astrocitomas anaplásicos e nove glioblastomas. Investigou quatro diferentes anticorpos para o Ki-67, sua relação com grau histológico e prognóstico, encontrando correlação entre o índice de proliferação dos quatro anticorpos nos astrocitomas de baixo grau (II) e de alto grau (III e IV). Em relação ao prognóstico, os pacientes com tumores com alto índice de Ki-67 foram aqueles que tiveram pior prognóstico.

KAYASELCUK et al. (2002) correlacionaram o Ki-67 com o tipo tumoral e grau de malignidade em tumores do sistema nervoso central, encontrando relação entre grau de malignidade e maior índice de Ki-67, bem como entre este e tipos histológicos reconhecidamente mais agressivos clinicamente (meduloblastoma, GBM, meningioma maligno e tumor neuroectodérmico primitivo).

ARAÚJO (2003), estudou a proteína do gene p53 e do EGFR na gênese e prognóstico de 45 portadores de GBM. A proteína ki-67 foi mensurada nestes tumores através do anticorpo MIB-1, estando expressa em 93% dos casos.

Em relação aos astrocitomas pilocíticos, BOWERS et al. (2003) estudaram o Ki-67 em 141 pacientes pediátricos, sendo que em 118 a imunorreatividade esteve

presente e nestes, ao ser realizada avaliação clínica retrospectiva, houve maior risco para a progressão tumoral.

## 2.6 ASPECTOS GENÉTICOS DO CÂNCER

Um dos componentes inerentes à vida celular é sua capacidade de auto-perpetuação, processo que deve ocorrer com grande precisão para duplicação celular efetiva. O ciclo vital de uma célula somática, como mencionado anteriormente, compreende a mitose, crucial para crescimento e diferenciação, e a interfase, a qual, dividida nos estágios G1, S e G2, compreende a maior parte do ciclo (THOMPSON; McINNES; WILLARD, 1991; MICHALIDES, 1999).

O estímulo da divisão celular parte de inúmeras proteínas que se ligam a receptores de membrana da célula, a qual utiliza, mediante expressão orquestrada de proto-oncogenes e genes supressores de tumor, complexo sistema para iniciar o ciclo celular (SHEER et al., 1996). Estes genes são responsáveis por interrupções em pontos de controles estratégicos, situados entre os estágios da interfase, denominados pontos de checagens, cuja finalidade é impedir a perpetuação de algum dano genético (HARTWELL et al., 1992; SHEER et al., 1996; MICHALIDES, 1999). O ponto de checagem mais importante é aquele presente no final de G1, o chamado ponto de restrição, já descrito previamente.

Mutações ou alterações cromossômicas nesses genes contribuem diretamente para o processo da carcinogênese e propagação do câncer porque resultam em acúmulo de mudanças excitatórias ou inibitórias em diferentes eventos das cascatas bioquímicas (SHEER, 1996; DIRKS; RUTKA, 1997).

A observação experimental idealiza que os oncogenes, embora possam ser iniciadores do processo da neoplasia, por si só não são suficientes na progressão para malignidade. Assim sendo, a perda dos genes supressores de tumor parece exercer maior influência à malignização (MICHALIDES, 1999).

Aparentemente, alterações no gene supressor de tumor p53 são os eventos mais comuns, variando de um percentual de 0 a 60% em diferentes neoplasias, chegando até 80% em alguns subtipos celulares mais agressivos (DARNTON,

1998). Pelo fato de ser um componente chave na regulação do ciclo celular, esse gene e seu produto, a proteína p53, vêm sendo pesquisados mediante técnicas diversas, dentre as quais a imunohistoquímica (ISHII et al., 1998; GIL-SALU et al., 2001; BIRNER et al., 2002; KORSHUNOV; GOLANOV; SYCHEVA, 2002).

## 2.7 p53

### 2.7.1 Estrutura e Funções

O gene supressor de tumor p53 em humanos está localizado no loco de subdivisão 13 do braço curto do cromossomo 17 (17p13). Composto por 11 *exons* intercalados por 10 *introns* (MILLER et al., 1986; ISOBÉ et al., 1986), codifica uma fosfoproteína nuclear de peso molecular equivalente a 53 kD, que contém uma seqüência de 393 aminoácidos (MAY; MAY, 1999).

A proteína p53 é composta por quatro domínios funcionais principais: um domínio amino-terminal (N-terminal), um extenso núcleo hidrófobo central, uma região de oligomerização e uma região carboxil-terminal (C-terminal) (CHO et al., 1994; MILNER, 1997; MAY; MAY, 1999). Pelo fato de interagir com uma seqüência específica de DNA, função exercida pelo núcleo hidrófobo, ela é caracterizada como ativador de transcrição seqüência-específica (FARMER et al., 1992; YONISH-ROUACH, 1997), podendo ser encontrados em células neoplásicas muitos resíduos mutados no interior desse domínio (CHO et al., 1994).

O domínio C-terminal, por outro lado, é capaz de se ligar não especificamente a várias formas danificadas de DNA visando seu reparo. A região de oligomerização parece estabilizar a atividade de ligação específica, sendo essencial para a transativação de seqüência específica em alguns casos. Várias proteínas celulares, sendo a MDM2 o exemplo mais clássico, podem inativar a p53 ao se ligarem ao domínio N-terminal (YONISH-ROUACH, 1997).

Deve-se salientar que apenas 5% das mutações podem acometer as porções N-terminal e C-terminal, a maioria, aproximadamente 95%, ocorrem no núcleo

hidrófobo (CHO et al., 1994). Logo, essa porção da molécula é a que está mais relacionada com a inativação da sua função.

A principal função da proteína p53 é mediar a resposta celular quando o DNA é danificado, auxiliando na manutenção da estabilidade genômica (SOUSSEI; FROMENTEL; MAY, 1990; YONISH-ROUACH, 1997). Dessa maneira, muitas formas de estresse genotóxico, incluindo radiações e alguns produtos químicos, induzem rápido aumento nos níveis da proteína p53 selvagem (YONISH-ROUACH, 1997). Mostra-se crítica, além disso, nas funções de parada do ciclo celular, inibindo a proliferação e participando da morte celular programada ou apoptose (ALBRECHTSEN et al., 1999; MAY; MAY, 1999).

### 2.7.2 p53 e as Vias de Parada do Ciclo Celular

A indução da parada do ciclo celular pela via p53, como descrito anteriormente, depende da habilidade de esta se comportar como verdadeiro ativador de transativação de seqüência específica (YONISH-ROUACH, 1997). O produto de vários genes com função de estacionar o ciclo celular pode ser induzido pela p53. Os principais são as proteínas p21, MDM2 e Gadd45.

O produto do gene Waf1/Cip1, a proteína p21, bloqueia a proliferação celular ao se ligar às CDKs ou ao PCNA, inibindo suas ações (XIONG et al., 1993).

O gene MDM2, localizado na região cromossômica 12q14.3-q15, codifica uma proteína de mesmo nome que inativa a p53 ao se ligar no seu domínio N-terminal. A transcrição dessa proteína é induzida pela p53 selvagem, criando um *feedback* auto-regulatório que controla, ao mesmo tempo, a atividade da p53 e a expressão da MDM2 (PICKSLEY; LANE, 1993). Em adição, pelo fato da MDM2 promover a degradação da p53, sua superexpressão é um mecanismo alternativo para escapar do controle do crescimento celular pela p53 (HALL; LANE, 1994).

A Gadd45 é outra proteína mediada pela p53 que pode estacionar o ciclo celular mediante ligação ao PCNA ou a p21 (YONISH-ROUACH, 1997).

### 2.7.3 p53 e as Vias de Apoptose

Enquanto a ativação de transativação parece ser essencial para a indução da parada do ciclo celular, sua função, no que diz respeito à apoptose, é controversa. Tem sido relatado que a p53 pode induzir apoptose através de vias dependentes e independentes da transativação (WAGNER; KOKONTIS; HAY, 1994).

Dentre os mediadores da via apoptótica induzidos pela p53, estão o gene *bax*, o qual acelera a apoptose através da ativação de caspases que alteram a estrutura da mitocôndria (MIYASHITA et al., 1994; MAY; MAY, 1999) e a Fas/APO-1, da família de receptores do fator de necrose tumoral, que promove transdução de sinal ao se ligar à proteína DR5, resultando na indução da cascata de caspases que levam à apoptose (WU; LEVINE, 1994). Uma terceira via para apoptose é mediada pela IGFBP-3, antagonista do IGF-1, que bloqueia a sinalização do fator de crescimento mitogênico (BASERGA, 1994).

### 2.7.4 p53, Imunohistoquímica e Astrocitomas

A imunohistoquímica é amplamente utilizada para detectar anormalidades na p53 em astrocitomas. Pelo fato da forma mutante dessa proteína ter uma meia-vida longa quando comparada à sua forma selvagem, essa técnica quase exclusivamente detecta a primeira forma, ou seja, a mutante (NEWCOMB et al., 1993). A imunomarcagem, mediante uso de anticorpo com epítomos contra a proteína p53, será positiva nas células neoplásicas, em que as formas selvagem ou mutante estiverem acumuladas, existindo forte correlação de sua superexpressão com mutações no gene p53 (HALL; LANE, 1994).

Muitas variáveis como quantidade do antígeno, afinidade com o anticorpo, concentração do anticorpo, duração das encubações, sensibilidade do sistema de detecção e fixação influenciam na detecção do antígeno na imunohistoquímica (HALL; LANE, 1994).

A evidência de um envolvimento causal da p53 na tumorigênese glial originou-se na observação da supressão da proliferação das células de GBM pela

p53 selvagem exógena (VAN MEIR et al.<sup>2</sup>, 1995 citado por LITOFISKY; RECHT, 1997), sendo as mutações da p53 em astrocitomas de adultos descritas pela primeira vez em 1989 (NIGRO et al.<sup>3</sup>, 1989 citado por LITOFISKY; RECHT 1997).

A perda ou mutação do gene supressor de tumor p53 tem sido detectada em muitos astrocitomas, representando um evento genético precoce (CHUNG et al., 1991; FULTS et al., 1992; SINDRASKI et al., 1992; VON DEIMLING et al., 1992; CHOZICK et al., 1994; VAN MEIR et al., 1994 citado por LITOFISKY; RECHT 1997; LOUIS; CAVENEE, 2003), o que é corroborado pela observação da perda do alelo do cromossomo 17p e mutações na p53, em aproximadamente 1/3 dos tumores grau II, III e IV de adultos, sugerindo que a inativação deste gene é importante na formação dos tumores grau II.

Em relação à progressão tumoral, embora a mutação da p53 seja um evento inicializador importante na tumorigênese dos astrocitomas, sua regra no que tange à progressão permanece controversa (ISHII et al., 1999; SARKAR et al., 2002; SHIRAISHI et al., 2002). Contudo, existem estudos demonstrando que astrocitomas de baixo grau que progridem para GBM têm alta taxa de mutação da p53 (REIFENBERGER et al., 1996; WATANABE et al., 1996; WATANABE et al., 1997). Esses GBMs são chamados secundários e correspondem a 90% desse grupo (DE ANGELIS, 2001).

Existem, entretanto, GBMs que, além de terem comportamento mais agressivo, não têm origem de glioma de menor grau de malignidade, sendo denominados glioblastomas primários. Do ponto de vista genético, estão associados à alta taxa de mutação do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), deleções no gene p16 e mutações do gene PTEN (WATANABE et al., 1996; DE ANGELIS, 2001), apresentando mutações no p53 em somente 10% dos casos (WATANABE et al., 1996).

2. VAN MEIR, E.G. et al. Single cell monitoring of growth arrest and morphological changes induced by transfer of wild-type p53 alleles to glioblastoma cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, n. 92, v. 4, p. 1008-1012, feb. 1995.

3. NIGRO, J.M. et al. Mutations in the p53 gene occur in diffuse human tumor types. **Nature**, 342, v. 6250, p. 705-708, dec. 1989.

Conforme mencionado anteriormente, neoplasias astrocitárias ocasionalmente podem ser resultado de radioterapia sobre o SNC. A análise genética dos tumores relacionados a essa etiologia evidenciou semelhanças com o GBM primário, isto é, a via p53 tem pouca influência nesses casos (BRAT et al., 1999).

A imunohistoquímica tem detectado proteína p53 mutante em 15% a 40% dos astrocitomas de baixo grau, 35% a 60% dos astrocitomas anaplásicos e 45% a 70% dos GBM (BRUNER et al., 1991; BARBARESCHI; LUZZOLINO; PENNELLA, 1992; ELLISON et al., 1992; LOUIS et al., 1993; NEWCOMB et al., 1993; VITAL et al., 1998; RANUNCULO et al., 2004).

BRUNER et al. (1991), baseando-se em estudos prévios que analisaram mutações no braço curto do cromossomo 17 em astrocitomas estudaram a proteína p53 em 71 biópsias de tumores cerebrais, sendo que esta esteve expressa em 20 dos 32 glioblastomas, cinco dos 12 astrocitomas anaplásicos e três dos cinco oligoastrocitomas anaplásicos. Observaram que a técnica imunohistoquímica para detecção da p53 mutada concordava com os métodos que estudavam mutações cromossômicas.

BARBARESCHI, LUZZOLINO e PENNELLA (1992) estudaram por imunohistoquímica a p53 e o PCNA em 86 tumores do SNC, sendo que a proteína p53 mutada esteve presente em 35 casos da série e somente naqueles tumores com diferenciação astrocitária, sendo mais freqüente nos casos de maior malignidade e não sendo encontrada na variante pilocítica. Não houve qualquer correlação entre grau de malignidade com o PCNA.

Em outro estudo, ELLISON et al. (1992) avaliaram a proteína p53 em 64 neoplasias astrocitárias e esta foi detectada em três dos 16 astrocitomas grau II, oito dos 14 astrocitomas anaplásicos e 24 dos 34 glioblastomas, estabelecendo uma relação entre p53 e grau de malignidade.

LOUIS et al. (1993), utilizando o anticorpo Pab1801 estudou a proteína p53 em 34 astrocitomas, sendo que esta esteve imunomarcada em três dos oito astrocitomas grau II, sete dos 12 grau III e sete dos 14 grau IV. Além disso, o número de células positivas foi maior nos tumores de alto grau (III e IV).

NEWCOMB et al. (1993) estudaram 37 GBMs mediante análise da proteína e do gene p53, sendo a mutação detectada, respectivamente, na proteína e no gene, em 65% e 46% dos casos, corroborando o fato de que algumas vezes a proteína está mutada sem haver necessariamente alteração no gene que a sintetiza.

VITAL et al. (1998) analisaram 100 astrocitomas grau II e verificaram proteína p53 mutada em 72% dos casos.

ARAÚJO (2003) estudou a proteína do gene p53 e o EGFR na gênese e prognóstico de 45 portadores de GBMs. Em relação à p53, esta esteve expressa em 85% dos casos.

RANUNCULO et al. (2004) estudaram 103 neoplasias astrocitárias e encontraram em 66% destes tumores proteína p53 mutada, sendo que esta teve correlação com o grau de malignidade.

Em relação ao tipo de astrócito, WATANABE et al. (1997) concluíram que astrocitomas de baixo grau com componente gemistocístico progridem mais rapidamente para malignidade e, tipicamente, têm mutações na p53, achados corroborados por outros autores (VITAL et al., 1998; KOSEL; SCHEITHAUER; GRAEBER, 2001), com exceção de MARTINS et al. (2001) e YANG et al. (2003).

As mutações da p53 nos astrocitomas pilocíticos são raras, mesmo nos esporádicos casos que sofrem progressão maligna (ISHII et al., 1998; HAAPASATO et al., 1999; HAYES et al., 1999; CHENG et al., 2000), sugerindo uma diferença genética em relação aos demais grupos. O mesmo ocorre nos xantoastrocitomas pleomórficos, em que, em duas séries com 14 pacientes cada, a mutação na p53 foi encontrada em somente três tumores. Um dado interessante é que no seguimento destes três casos com p53 mutada, dois sofreram progressão maligna (MUNOZ et al., 1996; PAULUS et al., 1996).



## 2.8 Ki-67, p53 e ASTROCITOMAS

Vários autores têm analisado as proteínas Ki-67 e p53, concomitantemente, em neoplasias astrocitárias.

JAROS et al. (1992) estudaram com imunohistoquímica, a expressão das proteínas p53, EGFR e Ki-67 em biópsias de 16 tipos de tumores cerebrais, sendo que da totalidade destes 43 eram astrocitomas. Observou-se que a imunorreatividade dos anticorpos era mais intensa conforme aumentava o grau de malignidade do tumor. Em relação aos tumores grau I, nenhum caso expressou a proteína p53 ou EGFR. A média do índice de proliferação do Ki-67 foi 1% nos astrocitomas graus I e II. Dos tumores grau II, 17% expressaram a p53 e 33% o EGFR. Em relação ao grau III, 38% foram positivos para proteína p53, 80% para o EGFR e 8,3% foi a média do índice de proliferação do Ki-67. Quanto aos tumores grau IV, 65% foram positivos para a proteína p53, 95% para o EGFR e 13,4% foi a média do índice de proliferação do Ki-67. Em relação ao prognóstico tumoral, usando análise monovariada, os pacientes que expressaram imunopositividade para p53, EGFR e Ki-67 em mais de 5% das células tumorais evoluíram com pior prognóstico. Na análise multivariada, grau e Ki-67 foram fatores independentes para o prognóstico. A correlação entre p53 e Ki-67 foi significativamente estatística.

ELLISON et al. (1995) estudaram os antígenos p53 e Ki-67 em 123 pacientes com neoplasias astrocitárias cerebrais. Os tumores foram divididos em graus de acordo com a classificação da OMS (1993), sendo 24 grau II, 31 astrocitomas anaplásicos e 68 GBMs. Em relação ao Ki-67, todos os casos evidenciaram imunomarcacão, embora com distintos padrões. Enquanto 96% dos tumores grau II tiveram índice de proliferação celular menor que 2%, os GBMs apresentaram em 86% dos casos índices maiores que 2%. Os astrocitomas anaplásicos evidenciaram índice de proliferação maior que 2% em 55% dos casos. Quanto à p53, essa foi negativa nos astrocitomas grau II, III e IV em 34%, 26% e 39%, respectivamente. Nos casos positivos o maior índice de imunomarcacão foi encontrado nos astrocitomas grau III, com mais de 60% em 32% dos casos. Ao compararem-se Ki-67 e p53, observou-se que nos astrocitomas com maior presença da p53, esta

mostrou-se maior que o índice de proliferação do Ki-67. Em relação ao prognóstico, estes tumores apresentaram relação estatisticamente significativa com a idade, grau histológico e Ki-67.

KORDEK et al. (1996) compararam a expressão da proteína p53 com o Ki-67 e PCNA em nove astrocitomas pilocíticos, 12 astrocitomas grau II, nove grau III e 30 grau IV. Em relação à proteína p53 foram imunomarcados, respectivamente, 0%, 41,7%, 33,3% e 53,3% dos casos. Estas porcentagens não se correlacionaram estatisticamente com Ki-67 ou PCNA.

PRAYSON e ESTES (1996) analisaram a expressão da p53 e Ki-67 em 18 astrocitomas de variante histológica protoplasmática, sendo que 28% expressaram a proteína p53 e nenhum tumor expressou imunomarcção para Ki-67. Os autores corroboraram com estes achados as observações clínicas compatíveis com tumor de crescimento lento.

CUNNINGHAM et al. (1997) estudaram a expressão das proteínas p53, Ki-67 e PCNA em 105 astrocitomas e 15 oligoastrocitomas. Em relação à variante histológica, 46,7% dos casos eram fibrilares, 19% gemistocíticos. Além disso, oito astrocitomas foram diagnosticados como de células gigantes e dois como glicossarcomas. Quanto ao grau histológico, 71% eram grau IV, 16% grau III e 13% grau II. Em relação a 102 pacientes, 85% evidenciaram imunomarcção para p53, sendo que em 42% destes casos, mais do que 10% das células tumorais estavam imunomarcadas. Não houve, entretanto, associação com idade, sexo ou grau tumoral. De 104 pacientes, 87% apresentaram marcação pelo MIB-1, sendo sua intensidade proporcional ao grau histológico, porém, não teve relação com a variante histológica. Em relação ao PCNA, dentre 107 casos, o índice de proliferação foi 5% ou menos em 20,6%, entre 6% e 20% em 37,4%, entre 21% e 40% em 25,2% e acima de 40% em 16,8% dos casos, tendo correlação somente com o grau histológico. Ao compararem-se as diferentes variáveis imunohistoquímicas, o coeficiente de correlação não apresentou significância estatística. Em relação ao prognóstico, utilizando análise monovariada, houve correlação com Ki-67 e PCNA, mas não com a p53.

MATSUMOTO et al. (1998) analisaram em 55 pacientes com menos de 30 anos de idade a utilidade da expressão do MIB-1 e p53 no diagnóstico diferencial entre astrocitomas de baixo (I e II) e alto (III e IV) graus, sendo a amostra constituída de 18 astrocitomas pilocíticos, 14 astrocitomas grau II, quatro astrocitomas anaplásicos e nove GBMs. As expressões do MIB-1 e p53 foram significativamente menores nos astrocitomas de baixo grau em relação aos de alto grau, observando-se que estes marcadores são úteis no diagnóstico diferencial entre os diferentes graus de malignidade quando associados a outras variáveis, mas não quando utilizados isoladamente.

HILTON et al. (1998) analisaram 96 pacientes com astrocitomas fibrilares supratentoriais submetidos à cirurgia, sendo que destes, 58 receberam radioterapia pós-operatória. Foram comparadas à sobrevida após a radioterapia com a expressão das proteínas p53 e Ki-67, não sendo encontrada correlação, tanto entre radioterapia e maior sobrevida quanto p53 e Ki-67 com sobrevida.

TIHAN et al (2000), analisando a expressão das proteínas p53 e Ki-67 em material proveniente de biópsias extereotáticas de 11 astrocitomas pilocíticos, oito grau II, 15 grau III e 16 grau IV, observaram forte associação com pior prognóstico nos casos que apresentaram índice de imunomarcagem do Ki-67 e p53 maior do que 15%, com exceção dos astrocitomas pilocíticos. Na mesma linha de estudo, GIL-SALU et al. (2001), estudando 40 casos de GBMs e 15 casos de astrocitomas anaplásicos, verificaram que pacientes portadores de tumores com menos de 8,6% das células marcadas para MIB-1 tiveram, juntamente com idade menor de 40 anos, índice de Karnofsky no pós-operatório maior que 70 e reoperação, maior sobrevida. REAVEY-CANTWELL et al. (2001) analisaram a relação da expressão da p53 e Ki-67 com a sobrevida de 32 pacientes com GBM e observaram que, enquanto a proteína p53 não tem qualquer relação com o prognóstico, o Ki-67 tem forte associação.

HARA et al. (2001) compararam a perda ou redução do DCC com o Ki-67 e a p53 em 119 astrocitomas, sendo 44 baixo grau, 36 grau III e 39 grau IV, verificando que a imunomarcagem das proteínas p53 e Ki-67 aumentava conforme o grau de malignidade tumoral. Entretanto, essa relação era inversa com o DCC.

## 2.9 IDADE E SEXO

Quanto à idade, estudos iniciais de neoplasias astrocitárias em pacientes pediátricos encontraram menos p53 mutante em relação aos adultos (LITOFISKY; HINTON; RAFFEL, 1994). Todavia, estudos subseqüentes não corroboraram estes achados (LANG et al., 1994; POLLACK et al., 1997). Recentemente, POLLACK et al. (2001), estudando astrocitomas de alto grau de malignidade, evidenciaram mutação da p53 em 11,8% dos pacientes com idade abaixo de três anos, mas em 40% das crianças acima dessa idade, uma diferença estatisticamente significativa, evidenciando que a patogênese desse câncer nos portadores acima de três anos de idade é semelhante à dos adultos, enquanto que nas crianças menores, outra via genética, provavelmente, é utilizada para o desenvolvimento tumoral.

De acordo com revisão de KLEIHUES e CAVENEE (2000), sexo e mutação da p53 não se correlacionam. Enquanto existem estudos (BRUNER et al., 1991; BARBARESCHI; LUZZOLINO; PENNELLA, 1992; ELLISON et al., 1992; LOUIS et al., 1993; NEWCOMB et al., 1993; CHOZUCK et al., 1994; VITAL et al., 1998) que sustentam estes achados, não existem pesquisas que os contestem.

### **3 PACIENTES E MÉTODOS**

O estudo foi realizado no Instituto de Pesquisas Médicas (IPEM) e no Laboratório de Imunohistoquímica do Centro Universitário Positivo (UNICENP), na cidade de Curitiba, após ter sido aprovado pelo comitê de ética (anexo). As amostras foram analisadas no Serviço de Patologia do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba (HUEC) quanto as suas variáveis de grau histológico, variante histológica, idade e sexo.

Foram utilizadas as Normas para Apresentação de Documentos Científicos da Universidade Federal do Paraná (2002); aplicadas as Normas para Referência Bibliográfica (NBR6023) e Abreviação de Títulos e Periódicos (NBR6032) da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT; Normas para Apresentação Gráfica de Dados e Tabelas, do Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social – IPARDES.

#### **3.1 AMOSTRA E SELEÇÃO**

A amostra consistiu de 47 blocos de parafina contendo neoplasias astrocitárias. Estes tumores eram provenientes de pacientes tratados no Serviço de Neurocirurgia do HUEC entre 1997 e 2001. Cada amostra foi submetida à avaliação histológica prévia para inclusão no estudo, sendo a seguir analisada e graduada de acordo com a classificação da OMS de 1993. Todos os tumores estavam identificados e processados de acordo com técnicas histológicas de rotina, conservados em solução de formol e tamponados e fixados em parafina.

#### **3.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO**

O estudo foi retrospectivo com delineamento tipo transversal não controlado.

### 3.3 HISTOLOGIA

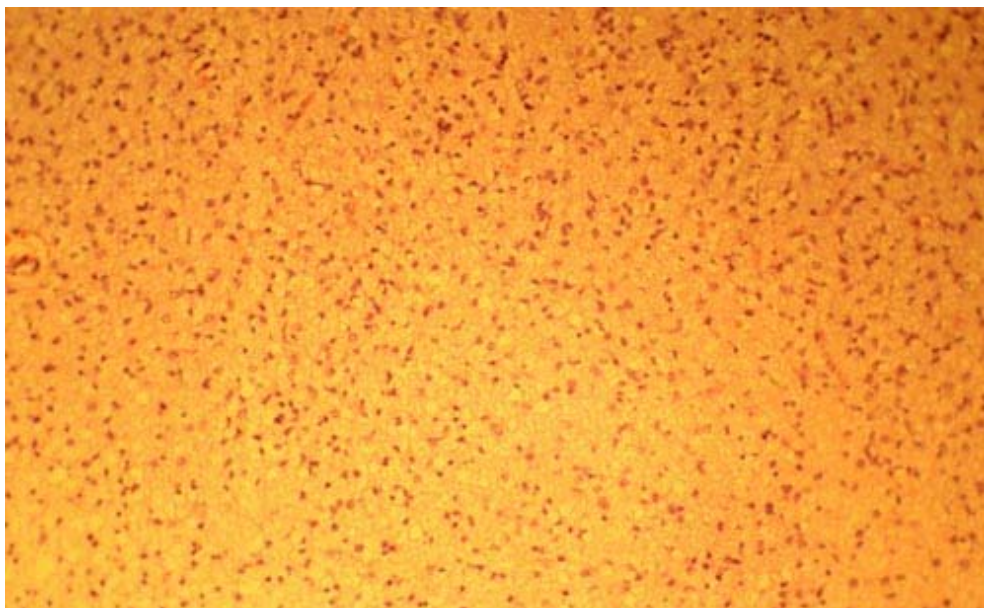
#### 3.3.1 Processamento Histológico

Os tumores estudados estavam emblocados em parafina de acordo com as descrições técnicas de BANCROFT e STEVENS (1977) e SPENCER (1982).

#### 3.3.2 Avaliação Histológica

Cada bloco histológico foi submetido à nova microtomia para obtenção de novos cortes com espessura de 3 $\mu$ m. A seguir, foram corados com a técnica de hematoxilina e eosina (H/E) e reavaliados independentemente por dois patologistas para se obter a confirmação do laudo histológico efetuado previamente. Os casos em que não houve concordância total entre os dois observadores foram submetidos à avaliação por neuropatologista. Os tumores foram distribuídos da seguinte forma: quatro tumores eram grau I (8,5%) (figura 7), 12 eram grau II (25,5%) (figura 2), cinco eram grau III (10,6%) (figura 3) e 26 eram grau IV (55,3%) (figuras 4 e 5). Em relação aos laudos da avaliação histológica prévia, somente dois casos necessitaram ser modificados devido à não concordância com a reavaliação referente ao tipo celular do astrocitoma: os casos 16 e 20, considerados previamente como fibrilares, foram reavaliados como sendo gemistocíticos porque a contagem celular revelou a presença de células gemistocíticas superiores a 20% do conteúdo celular tumoral total.

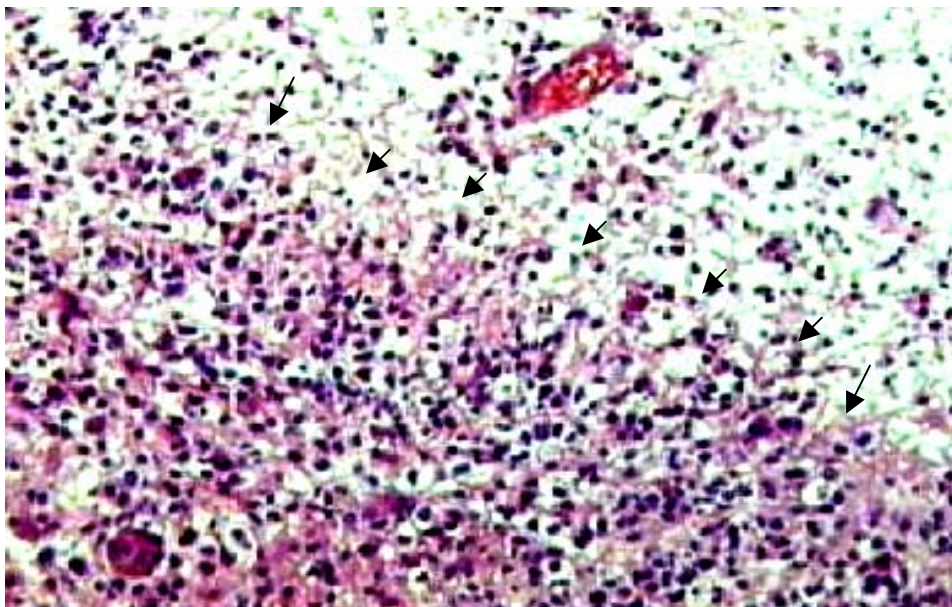
FIGURA 2 – NEOPLASIA ASTROCITÁRIA GRAU II



LEGENDA: caso 32, coloração H/E com aumento de 100X.

NOTA: observa-se proliferação celular pouco intensa e ausência de necrose ou proliferação endotelial. Variante histológica fibrilar.

FIGURA 3 – NEOPLASIA ASTROCITÁRIA GRAU III

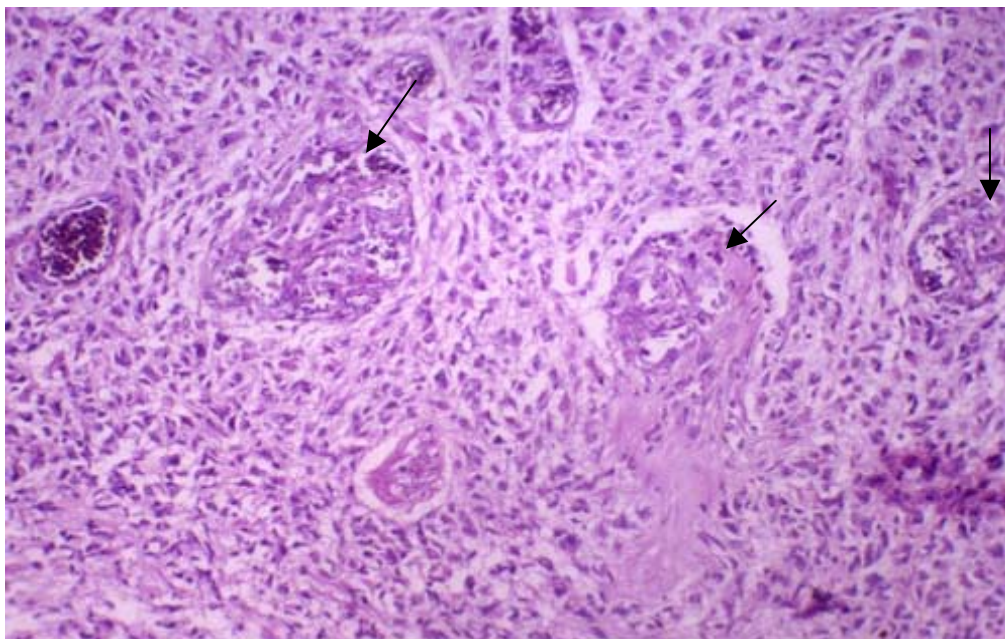


LEGENDA: caso 27, coloração h/e com aumento de 100x.

NOTA: observa-se transição de área de intensa proliferação celular (setas), bem como ausência de proliferação endovascular e necrose. Variante histológica fibrilar.



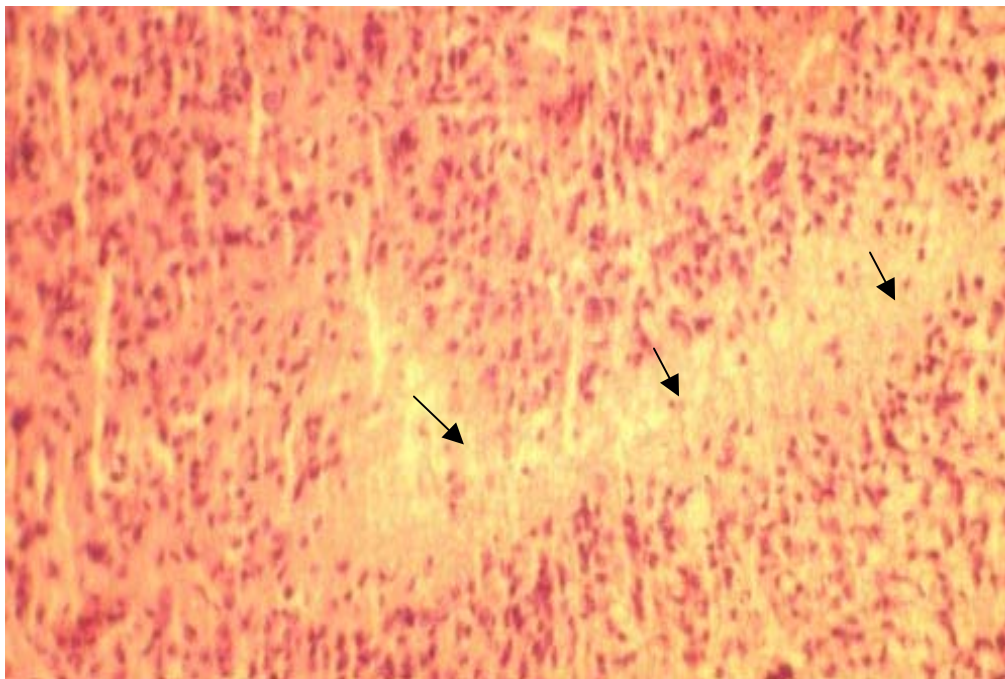
FIGURA 4 – NEOPLASIA ASTROCITÁRIA GRAU IV



LEGENDA: caso 40, coloração H/E com aumento de 100X.

NOTA: observa-se a presença de proliferação endotelial de padrão glomerulóide (setas). Variante histológica fibrilar.

FIGURA 5 – NEOPLASIA ASTROCITÁRIA GRAU IV



LEGENDA: caso 43, coloração H/E com aumento de 100X.

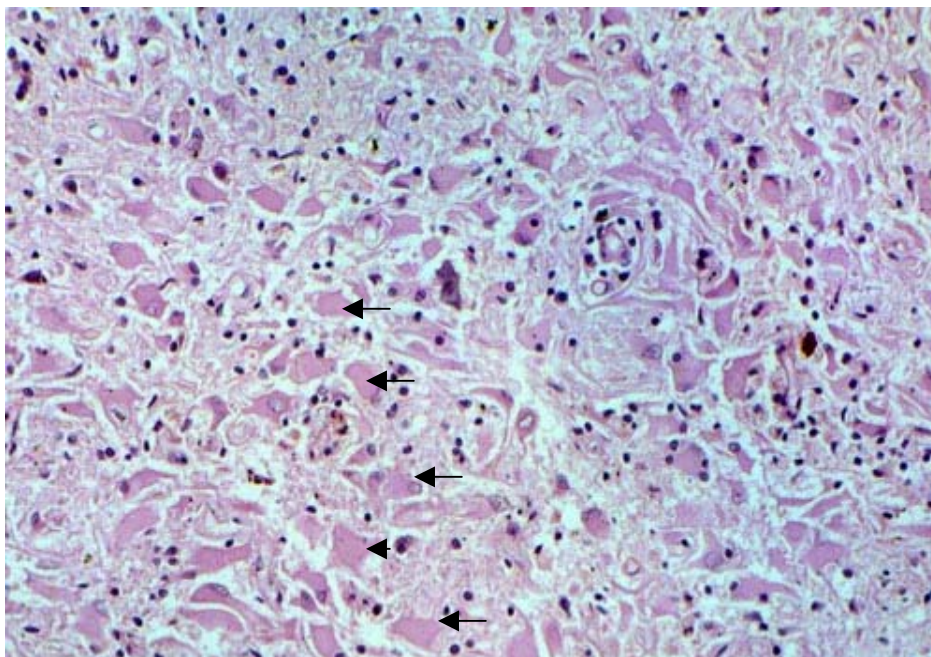
NOTA: Tumor tipo fibrilar, no qual observa-se o clássico padrão de necrose em paliçada (setas).



Quanto à variante histológica, seis tumores eram gemistocíticos (13%) (figura 6), quatro eram pilocíticos (8%) (figura 7) e 37 eram fibrilares (79%) (figuras 2, 3, 4 e 5). Estes dados estão apresentados no quadro 2.

Em relação à variante histológica, os tumores gemistocíticos foram aqueles com o mínimo de 20% de células gemistocíticas, calculado pelo Índice de Astrócitos Gemistocíticos (IAG), que é a razão entre o número de gemistocitos e o número total de células neoplásicas contadas, sendo estas no mínimo 1000 (MARTINS et al., 2001).

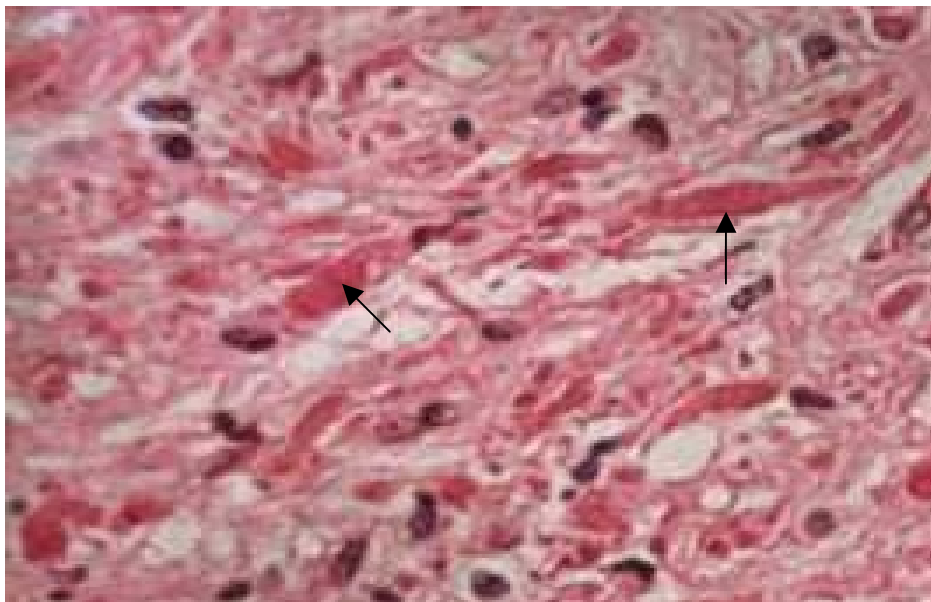
FIGURA 6 – NEOPLASIA ASTROCITÁRIA GEMISTOCÍTICA



LEGENDA: caso 28, coloração H/E com aumento de 100X.

NOTA: observa-se neste tumor grau II discreta proliferação celular e células com amplo citoplasma eosinofílico (setas).

FIGURA 7 – NEOPLASIA ASTROCITÁRIA PILOCÍTICA



LEGENDA: caso 46, coloração h/e com aumento de 400x.

NOTA: observa-se neste tumor grau I discreta proliferação celular e fibras de Rosenthal (setas).

QUADRO 2 – DESCRIÇÃO DA AMOSTRA DE 47 NEOPLASIAS ASTROCITÁRIAS (1997/2001)

CASO	IDADE	SEXO	GRAU	VARIANTE
1	62	M	I	Pilocítico
2	52	F	II	Fibrilar
3	52	M	IV	Fibrilar
4	50	F	IV	Fibrilar
5	71	F	IV	Fibrilar
6	51	M	IV	Fibrilar
7	16	F	II	Fibrilar
8	85	F	I	Pilocítico
9	46	M	IV	Fibrilar
10	61	F	IV	Fibrilar
11	20	F	IV	Fibrilar
12	38	M	II	Fibrilar
13	78	M	II	Fibrilar
14	47	F	III	Fibrilar
15	8	M	I	Pilocítico
16	22	F	IV	Gemistocítico
17	25	M	II	Fibrilar
18	21	F	IV	Fibrilar
19	34	F	IV	Fibrilar
20	45	M	IV	Gemistocítico
21	56	M	IV	Fibrilar
22	47	M	IV	Gemistocítico
23	29	F	II	Fibrilar
24	39	F	II	Gemistocítico
25	55	M	IV	Fibrilar
26	47	F	IV	Fibrilar
27	26	F	III	Fibrilar
28	45	M	II	Gemistocítico
29	66	F	IV	Fibrilar
30	63	F	IV	Fibrilar
31	59	M	IV	Fibrilar
32	70	F	II	Fibrilar
33	56	M	IV	Fibrilar
34	27	F	IV	Fibrilar
35	40	M	II	Fibrilar
36	57	F	IV	Fibrilar
37	61	M	II	Fibrilar
38	62	M	IV	Fibrilar
39	32	F	IV	Fibrilar
40	58	M	IV	Fibrilar
41	27	F	III	Fibrilar
42	58	M	III	Fibrilar
43	40	M	IV	Fibrilar
44	34	F	II	Fibrilar
45	48	M	IV	Gemistocítico
46	4	M	I	Pilocítico
47	63	F	III	Fibrilar

FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor

### 3.4 IMUNOHISTOQUÍMICA

#### 3.4.1 Procedimento Imunohistoquímico

A imunoexpressão das proteínas Ki-67 e p53 foi obtida através do método imunoenzimático da streptoavidina-biotina-peroxidase. Este consiste nas seguintes etapas: inicialmente foram obtidos cortes histológicos de 3 $\mu$ m do material emblocado em parafina, sendo estes estendidos sobre lâminas previamente limpas, desidratadas e silanizadas. Em seguida, este material foi colocado em estufa a 37°C pelo período noturno para desfragmentação da parafina. O passo seguinte foi a desparafinização da lâmina com dois banhos de xilol com duração de dez minutos cada. Seguiu-se a isso a desidratação do material com etanol absoluto e, na seqüência, banho de dez minutos em solução de hidróxido de amônio a 10% para a remoção dos pigmentos formólicos.

A próxima etapa foi a de recuperação antigênica. Cabe ressaltar que para a recuperação do antígeno contido no tecido e quebra das ligações cruzadas provocadas pelo formol, os cortes foram submetidos à solução de ácido cítrico na concentração de 0,01 M e pH 6,0 em microondas por 15 minutos (três vezes de cinco minutos), seguido de resfriamento à temperatura ambiente. A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente, seguidas de passagem por água destilada e, então, executou-se o bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3%.

Para que não ocorressem alterações significativas de pH, os cortes foram submetidos à rápida incubação em solução tampão TRIS na concentração de 0,05 M e pH 7,4. As lâminas foram incubadas com anticorpo primário contra o Ki-67 e a p53 durante 18 horas (*overnight*) a 4°C, em câmara úmida, em solução tampão, pH 7,4, acrescido de albumina bovina a 1% contendo azida sódica a 0,1% (Azida Sódica<sup>®</sup>, Biotest S/A, São Paulo, Brasil). Esta diluição, em relação à p53, foi estabelecida previamente pela titulação do anticorpo primário em estudo realizado por Giovanini (2001). Para a incubação do anticorpo secundário e complexo terciário

(streptoavidina- biotina com peroxidase) utilizou-se o “kit LSAB<sup>®</sup>” (DAKO número KO, 690). Para revelar a reação antígeno-anticorpo as lâminas foram incubadas em 300mg do cromógeno 3,3- diaminobenzidina (diaminobenzidina<sup>®</sup>, Sigma Chemical, St. Louis, USA) em 100ml de solução tampão, pH 7,4, previamente filtrados e ativados sob indução de 600µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 6%, em temperatura ambiente, durante três minutos em câmara escura. Após a incubação, as lâminas foram submersas em solução tampão novamente, seguidas de lavagem em água corrente e água destilada.

Os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer durante dez minutos e lavados brevemente em água corrente e, após, água destilada. As lâminas seguiram para desidratação em bateria ascendente de etanol durante cinco minutos cada (respectivamente 70%, 80%, 95% e absoluto), seguida de diafanização em xilol e montagem com lâmina para análise em microscópio de luz.

#### 3.4.2 Anticorpos para Antígenos Ki-67 e p53

Utilizaram-se os anticorpos primários contra o Ki-67 (MIB-1, DAKO, Dinamarca, diluição de 1:500) e a p53 (clone DO-7<sup>®</sup>, DAKO/AS, Dinamarca, diluição de 1:50).

#### 3.4.3 Análise Quantitativa da Expressão do Ki-67 e p53

Foram selecionados cortes histológicos para o estudo imunohistoquímico a partir de preparações coradas pela H/E, representativos da neoplasia e sem artefatos técnicos. Cortes com extensas áreas de necrose foram descartados devido a possíveis vieses de aferição na avaliação imunohistoquímica.

A análise das células imunopositivas para os anticorpos contra p53 e Ki-67 foi realizada com duas repetições em campos definidos e escolhidos aleatoriamente, sendo consideradas positivas somente marcações em núcleos, de coloração

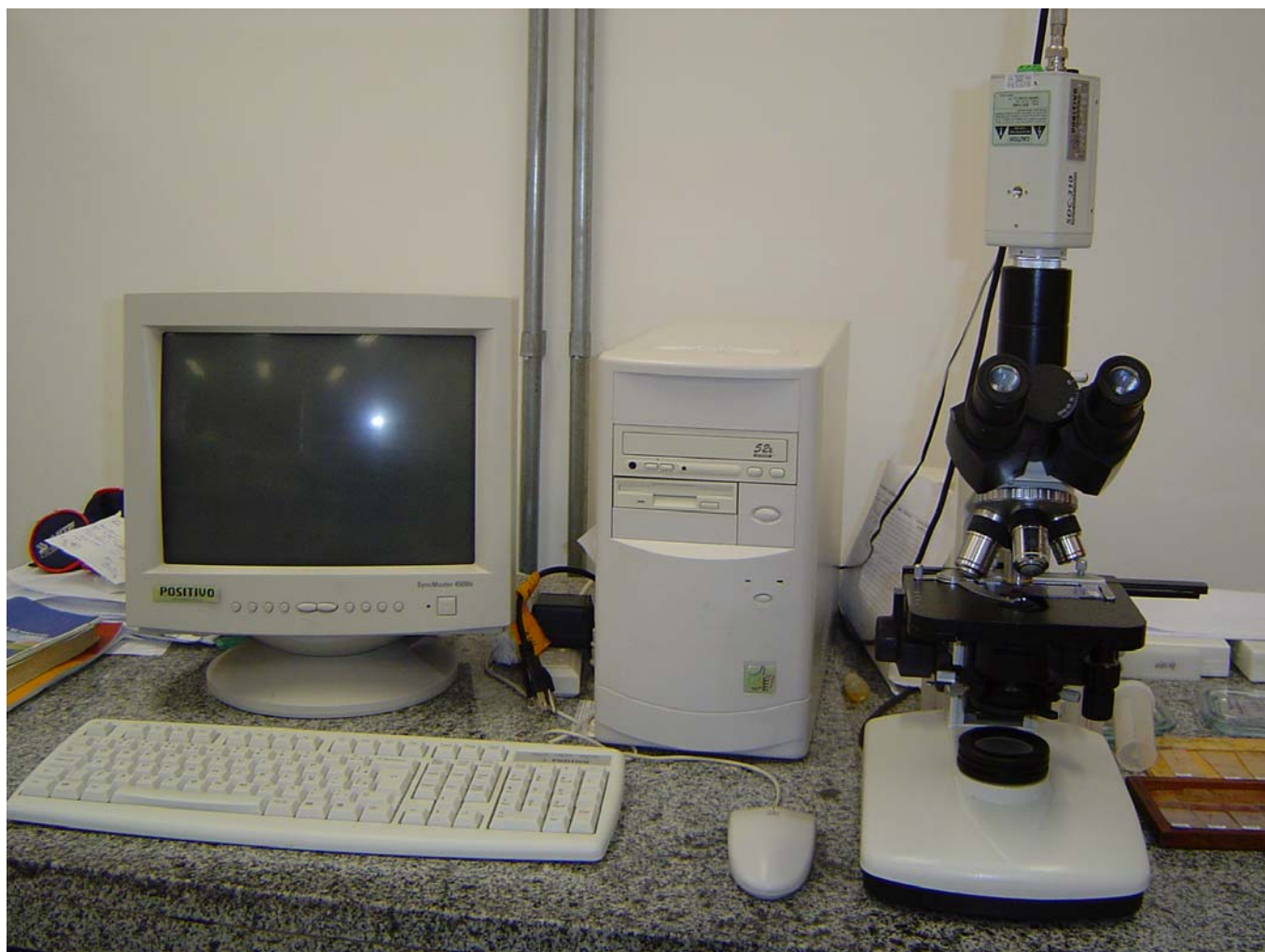
castanha, independente da intensidade da coloração, somente com suficiência para diferenciação entre positivo e negativo.

Os 47 casos submetidos ao estudo foram preparados pelo mesmo pesquisador, de acordo com o antígeno estudado, e avaliados da mesma forma pelos mesmos observadores.

Os controles foram casos de câncer mamário com intensa imunomarcação para ambos os antígenos deste estudo.

As imagens de cada campo foram obtidas em microscópio, com aumento de 400 vezes, sendo, a seguir, transferidas para um monitor acoplado a um sistema computadorizado, onde foram quantificados os núcleos que expressavam imunomarcação para a Ki-67 e p53, após sua individualização pelo *software Imagelab-Softium*. O material de análise foi um computador Pentium 300MHz, com placa de aquisição de imagem. As imagens de campo obtidas em um microscópio Laborlux-Leitz, acoplado a um sistema de câmera JVC (modelo TK 870 U), foram transferidas para um monitor de TV Multisync M 700 (figura 8).

FIGURA 8 – MATERIAL DE ANÁLISE DAS LÂMINAS



LEGENDA: microscópio e computador utilizados na análise imunohistoquímica.

A imunorreatividade foi dividida conforme o número de células imunomarcadas em um total de 1000 células contadas em campos com 400 aumentos.

Em relação ao Ki-67, a quantificação imunohistoquímica foi obtida com a razão paramétrica absoluta entre os núcleos de células positivas e o número total de células tumorais contadas, sendo estabelecidos três grupos, que foram 1. ausência de células marcadas, 2. menos de 5% das células marcadas e 3. mais de 5% das células marcadas (KORSHUNOV; GOLANOV; SYCHEVA, 2002).

Quanto à avaliação da p53, a quantificação imunohistoquímica foi obtida com a razão paramétrica absoluta entre os núcleos de células positivas e o número total

de células tumorais, sendo aplicado o seguinte esquema: 0 - sem marcação; 1+ - marcação em menos de 25% das células tumorais; 2+ - marcação entre 25 e 50% das células tumorais; 3+ - marcação entre 50 e 75% das células tumorais e 4+ - marcação em mais de 75% das células tumorais, de acordo com estudo prévio (KURTKAIA-YAPICIER et al, 2002).

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada no *software Statistical Package for Social Science* (SPSS) 10.0 *for windows*.

O Coeficiente de Correlação de Spearman foi utilizado para o estudo das correlações entre duas variáveis contínuas, correlacionando a variável grau com Ki-67, p53 e idade, bem como as variáveis Ki-67 e p53 entre si. A Regressão Logística foi utilizada para avaliar interação ou confusão das variáveis sexo e idade sobre a expressão p53 e Ki-67. O Teste de Wilcoxon-Mann-Whitney foi utilizado para se testar a homogeneidade dos dois grupos (com e sem expressão de p53 e Ki-67) em relação às variáveis p53, ki-67, grau e idade. O Teste de Qui-quadrado foi utilizado para testar a homogeneidade dos dois grupos em relação à variante histológica e ao sexo.

A análise descritiva da idade foi realizada através da observação do cálculo de médias e desvios-padrão. Para a variável gênero foi calculada a frequência absoluta.

Todos os testes foram realizados, no SPSS, de forma bi-caudal e admitindo-se como estatisticamente significativos os valores de P menores que 0,05.



## 4 RESULTADOS

Na tabela 1 estão apresentadas as medidas descritivas das variáveis analisadas, através de suas medianas, acompanhadas pelos intervalos interquartil (percentil 25 a percentil 75), da média acompanhada do desvio-padrão, e da frequência absoluta.

TABELA 1 – VARIÁVEIS ESTUDADAS E MEDIDAS DESCRITIVAS (1997/2001)

Variável	Medida Descritiva
Idade	46 +- 18 <sup>1</sup>
Gênero	
Feminino	24 (51%)
Masculino	23 (49%)
Grau	
I	4 (8%)
II	12(25%)
III	5(11%)
IV	26 (55%)
Ki-67	9 (2 a 31) <sup>2</sup>
p53	0 (0 a 1) <sup>2</sup>
Variante	
Fibrilar	37 (79%)
Gemistocítico	6 (13%)
Pilocítico	4 (8%)

FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.

NOTA: n=47

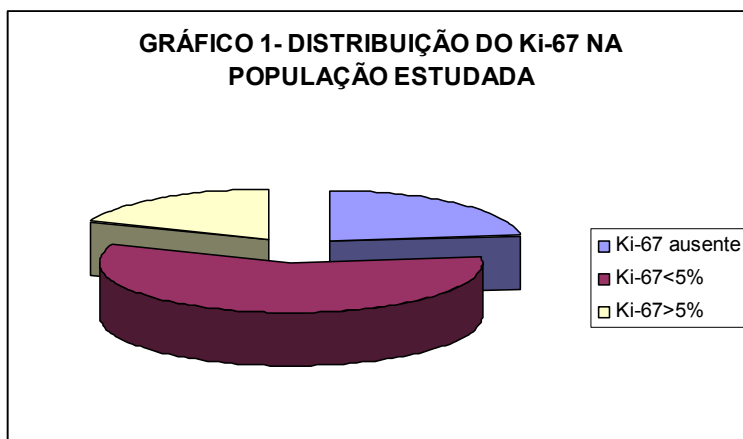
(1) média com desvio padrão

(2) mediana (intervalo interquartil)

### 4.1 RESULTADOS IMUNOHISTOQUÍMICOS

#### 4.1.1 Ki-67

As reações tiveram positividade nuclear e em nenhum caso esta esteve presente no citoplasma. A distribuição da amostra está apresentada no gráfico 1.

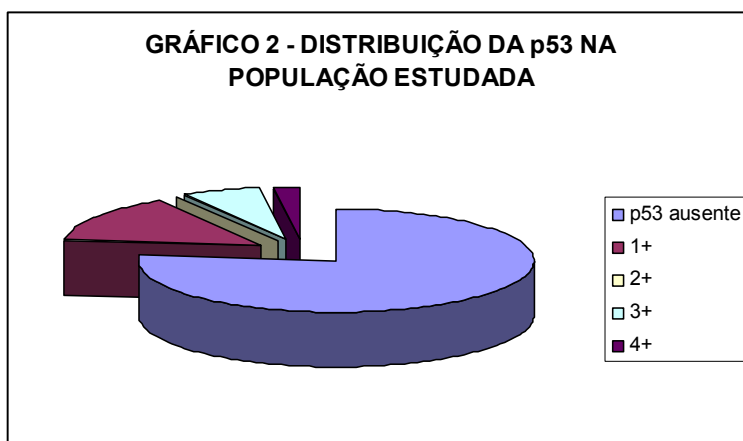


FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.

Entre os casos positivos, 28 apresentaram menos de 5%, de um total de 1000 células contadas em campo de 400 aumentos, e nove tiveram este percentual maior de 5%.

#### 4.1.2 p53

As reações tiveram positividade nuclear e nenhum caso apresentou reação de fundo. A distribuição da p53 está expressa no gráfico 2.

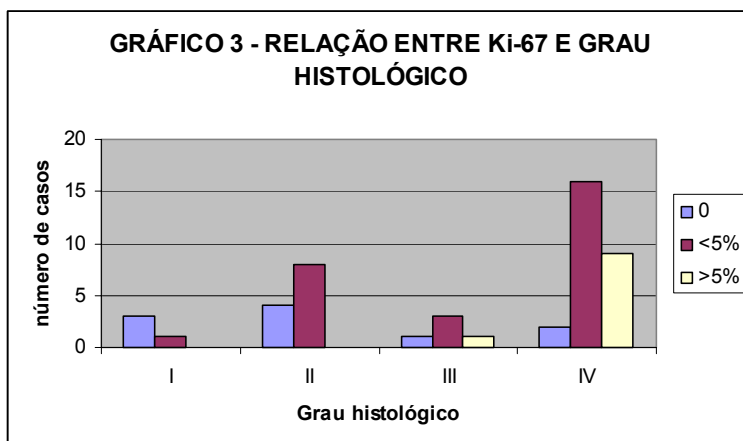


FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.

Trinta e seis casos foram negativos para a proteína p53 mutada. Dentre os casos positivos, o maior número (seis casos) estava no grupo com imunomarcação menor do que 25% das células tumorais (1+).

#### 4.2 GRAU HISTOLÓGICO E KI-67

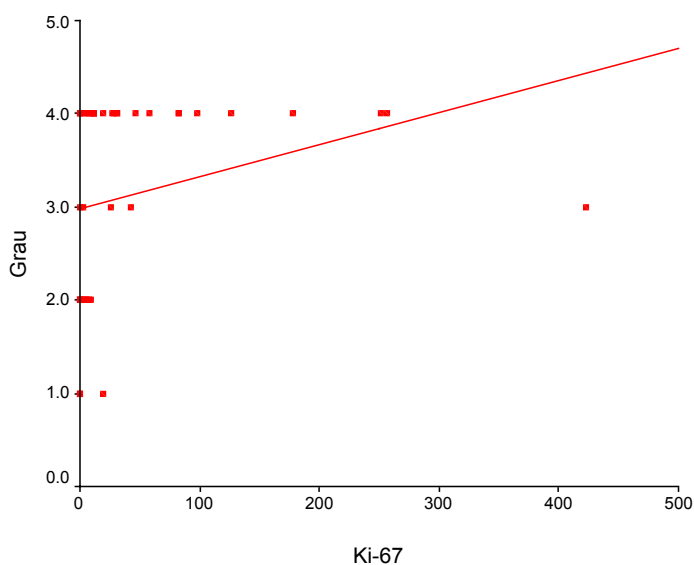
O grau histológico que teve maior correlação, tanto qualitativa quanto quantitativamente, com o antígeno Ki-67 foi o grau IV, enquanto que nos tumores de grau I esta correlação foi menor. Os dados estão expressos no gráfico 3.



FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.

Quanto a correlação linear entre Ki-67 e grau histológico os resultados estão expressos no gráfico 4.

#### GRÁFICO 4 - CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE Ki-67 e GRAU HISTOLÓGICO



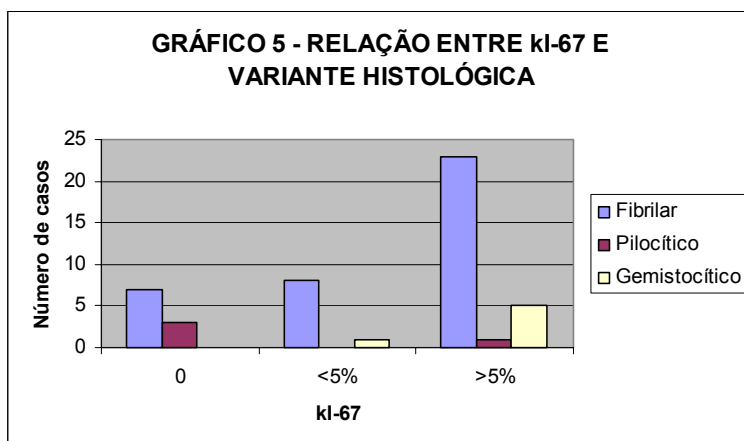
FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.

NOTA:  $P < 0,001$

NOTA ESPECÍFICA: no eixo horizontal Ki-67 corresponde ao número de células imunomarcadas, enquanto no eixo vertical 1, 2, 3 e 4 correspondem, respectivamente, aos graus I, II, III e IV.

#### 4.3 VARIANTE HISTOLÓGICA E KI-67

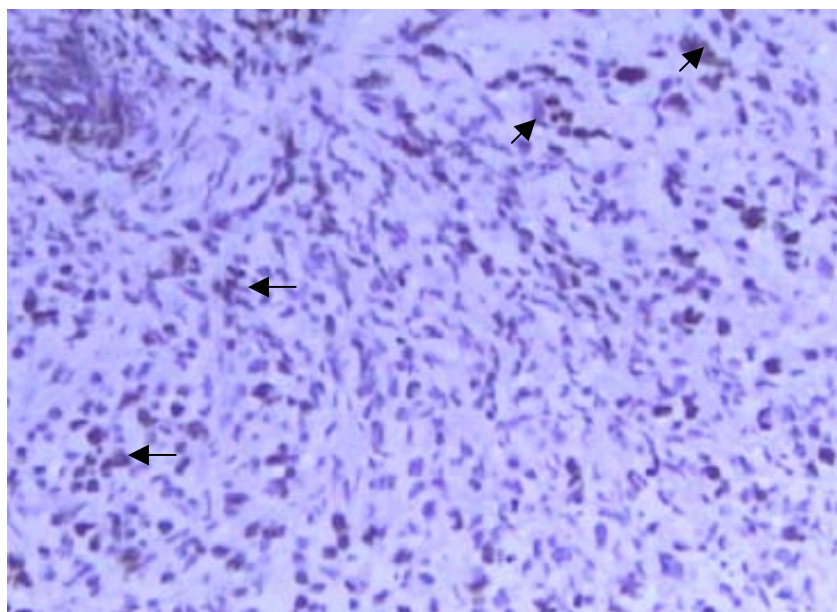
A variante histológica que teve maior correlação com a proteína Ki-67 foi a fibrilar (Figuras 9 e 10) e a que teve menor foi a pilocítica. Os dados estão no gráfico 5.



FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.

Aplicando o teste de qui-quadrado para testar a homogeneidade do Ki-67 entre as variantes pilocítica, fibrilar e gemistocítica, foi encontrada diferença estatisticamente significativa ( $P=0,02$ ), sendo que as variantes fibrilar e gemistocítica apresentaram uma frequência de expressão de aproximadamente 80%, enquanto a pilocítica apresentou apenas 20%.

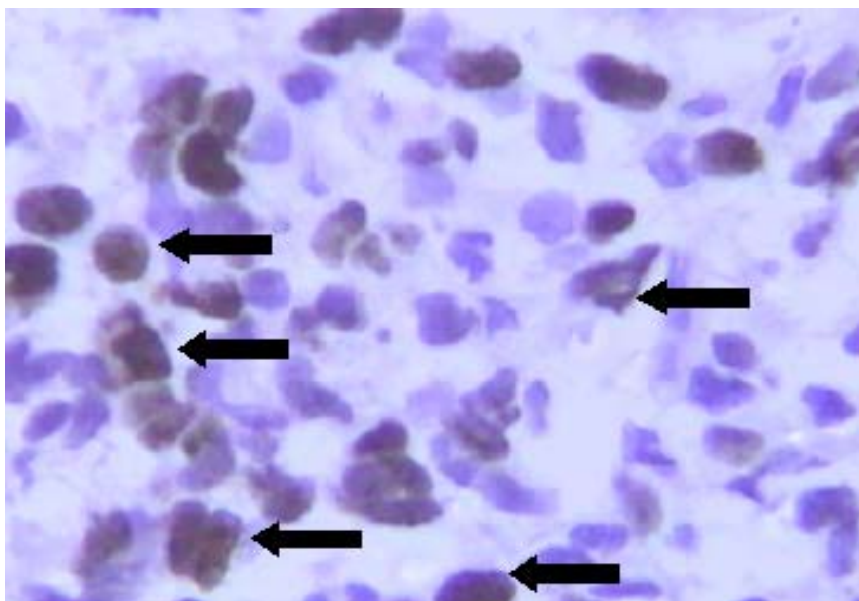
FIGURA 9 - Ki-67 EM NEOPLASIA ASTROCITÁRIA GRAU IV



LEGENDA: caso 20, neoplasia astrocitária grau IV em aumento de 100X.

NOTA: as setas indicam um grupo de núcleos celulares que representam a imunorreatividade do antígeno Ki-67. Variante histológica fibrilar.

FIGURA 10 - Ki-67 EM NEOPLASIA ASTROCITÁRIA GRAU IV.

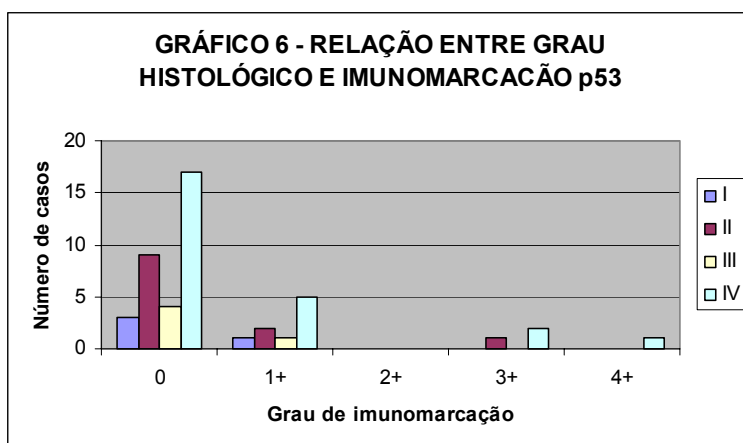


LEGENDA: caso 20. GBM em aumento de 400X.

NOTA: as setas indicam alguns dos núcleos imunomarcados pelo MIB-1. Variante histológica fibrilar.

#### 4.4 GRAU HISTOLÓGICO E p53

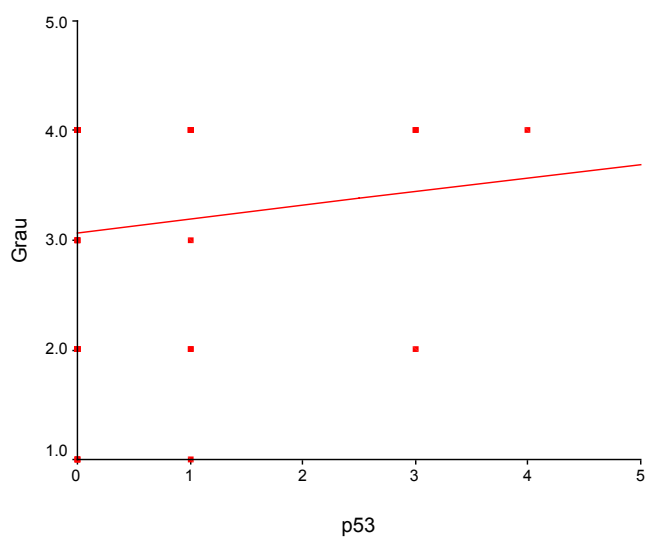
O grau histológico que teve maior correlação com a presença da p53, qualitativamente e quantitativamente, foi o grau IV (34,6%) (figura 11), enquanto que o grau III foi o que apresentou a menor correlação (figura 12), com 20% dos casos positivos. Estes resultados estão apresentados no gráfico 6.



FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.

A correlação linear entre grau histológico e p53 está expressa no gráfico 7.

GRÁFICO 7- CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE P53 E GRAU HISTOLÓGICO

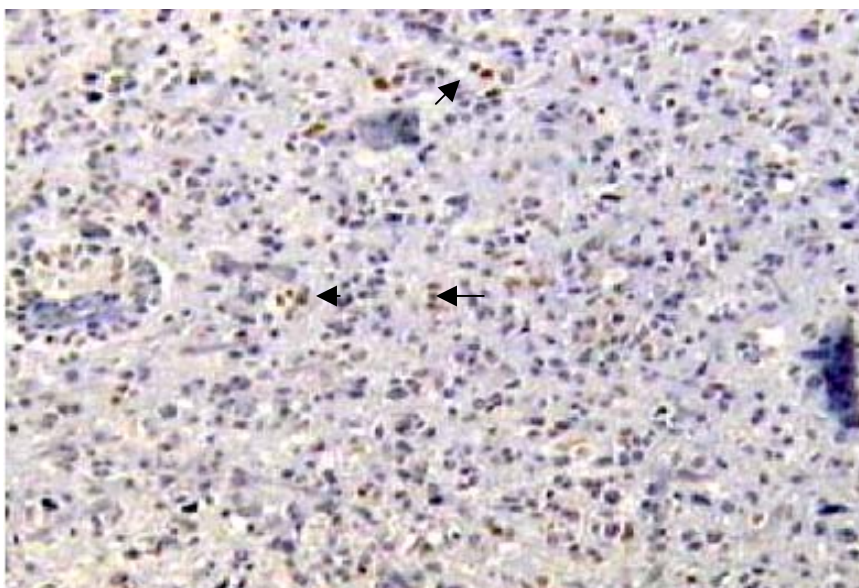


FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.

NOTA:  $P = 0,59$

NOTA ESPECÍFICA: no eixo horizontal p53 0,1,2,3 e 4 correspondem, respectivamente a 0, 1+, 2+, 3+ e 4+, enquanto no eixo vertical 1, 2, 3 e 4 correspondem, respectivamente, aos graus I, II, III e IV.

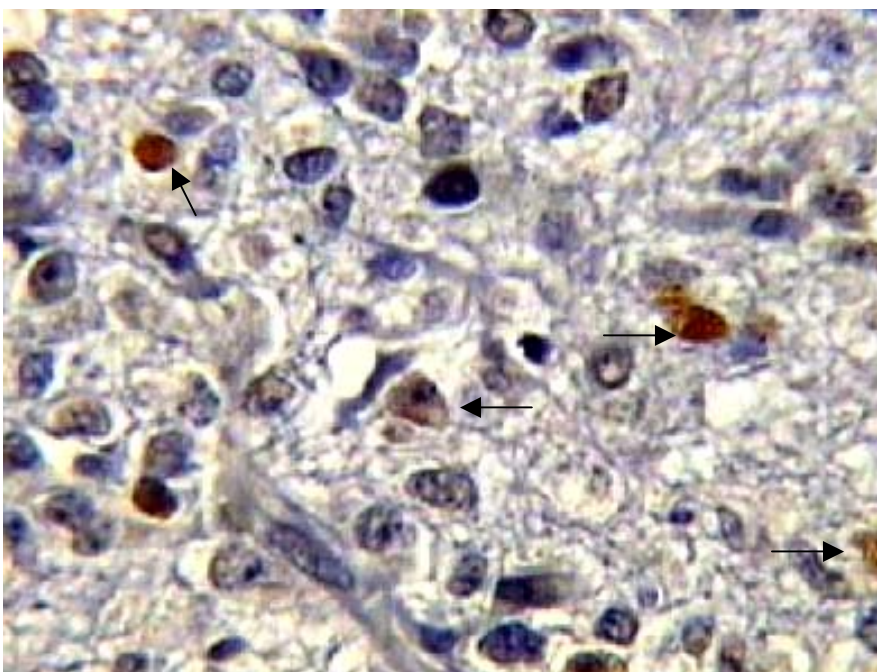
FIGURA 11 – p53 EM NEOPLASIA ASTROCITÁRIA GRAU IV



LEGENDA: caso 11, técnica imunohistoquímica para p53 com aumento de 100X.

NOTA: observam-se núcleos de coloração castanha (setas), indicando que nestes a proteína p53 encontra-se mutada. Variante histológica fibrilar.

FIGURA 12 – p53 EM NEOPLASIA ASTROCITÁRIA GRAU III



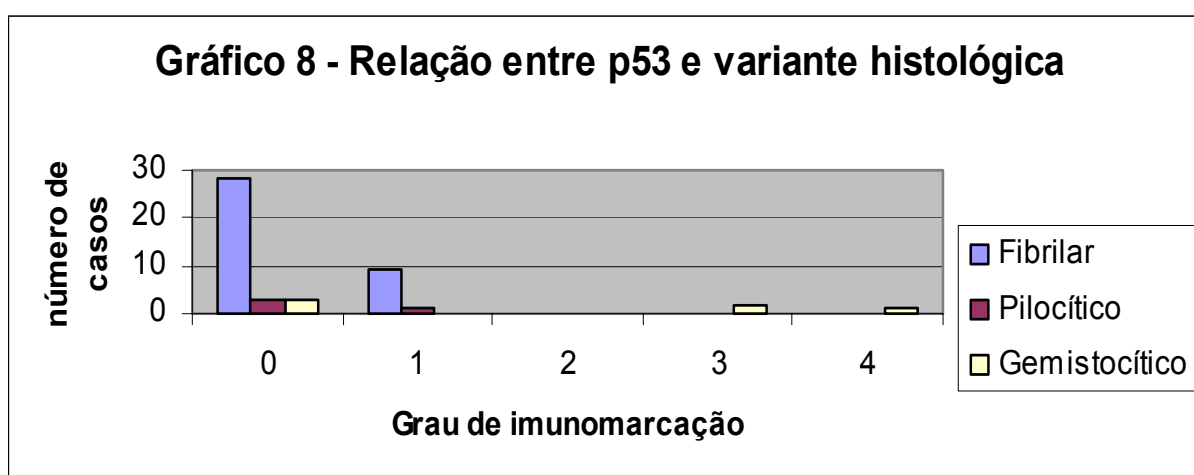
LEGENDA: caso 14, técnica imunohistoquímica para p53 com aumento de 400X.

NOTA: observam-se núcleos de coloração castanha (setas) indicando a p53 mutada. Variante histológica fibrilar.



#### 4.5 VARIANTE HISTOLÓGICA E p53

Os tumores com variante histológica gemistocítica foram proporcionalmente os que mais se correlacionaram com imunopositividade p53 (50%), seguidos pelo tipo fibrilar (figuras 10 e 11), enquanto a variante pilocítica foi a que teve menor correlação (25%). Os resultados estão apresentados no gráfico 8.

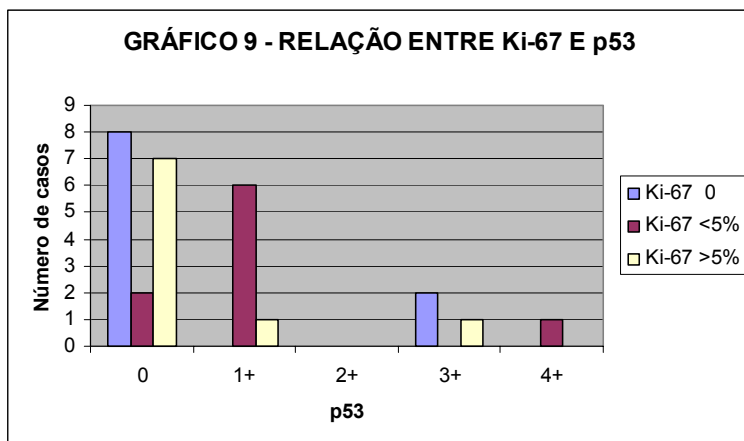


FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.

Quando aplicado o Teste do Qui-quadrado para a presença ou não da p53 nas diferentes variantes histológicas, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ( $P=0,42$ ).

#### 4.6 Ki-67 e p53

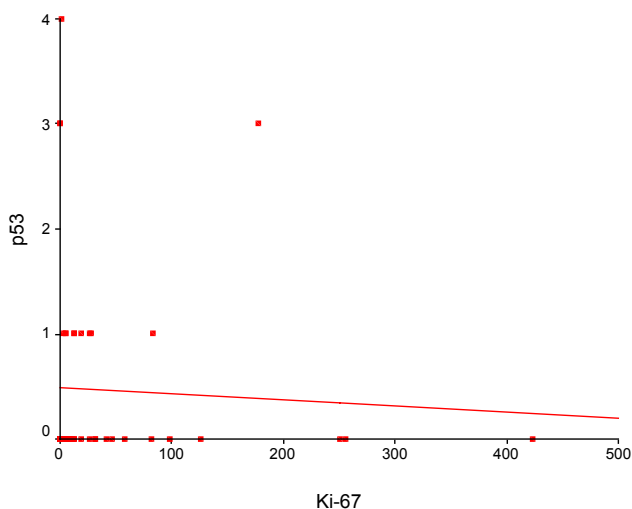
Os resultados entre Ki-67 e p53 estão apresentados no gráfico 9.



FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.

A correlação linear entre Ki-67 e p53 está expressa no gráfico 10.

**GRÁFICO 10 - CORRELAÇÃO LINEAR ENTRE Ki-67 E p53**



FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.

NOTA:  $P = 0,76$

NOTA ESPECÍFICA: na escala horizontal está o número de núcleos imunomarcados, enquanto na escala vertical 0, 1, 2, 3 e 4, correspondem, respectivamente a 0, +1, +2, +3 e +4.

Não houve qualquer correlação estatisticamente significativa entre Ki-67 e p53.

As tabelas 2 e 3 apresentam as medidas sumarizadas, separadas por grupo. Também é apresentado o nível de significância do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. Nenhuma das variáveis comparadas apresentou diferença estatisticamente significativa na comparação entre os dois grupos.

TABELA 2 - COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS, ATRAVÉS DO TESTE DE WILCOXON-MANN-WHITNEY, ENTRE OS PACIENTES COM p53 E SEM p53 (1997/2001)

Parâmetro	p53 presente n=13	p53 ausente n=34	Valor- P
Grau	4 (2 a 4) <sup>1</sup>	4 (2 a 4)	0,94
Ki-67	8,5 (1,5 a 43) <sup>1</sup>	12 (1,5a 27)	0,65
Idade	45 ± 20 <sup>2</sup>	48 ± 12	0,43

FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.

(1) Med (IQ): mediana e intervalo interquartil (percentil 25 a percentil 75).

(2) Média com desvio padrão.

TABELA 3 - COMPARAÇÃO DAS VARIÁVEIS, ATRAVÉS DO TESTE DE WILCOXON-MANN-WHITNEY, ENTRE OS PACIENTES COM Ki-67 E SEM Ki-67 (1997/2001)

Parâmetro	Ki-67 presente n=37	Ki-67 ausente n=10	Valor- P
Grau	2 (1 a 3) <sup>1</sup>	4 (2,5 a 4)	0,36
p53	0 (0 a 0,7) <sup>1</sup>	0 (0 a 1)	0,18
Idade	39 (18 a 72) <sup>2</sup>	48 (34 a 58)	0,90

FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.

(1) Med (IQ): mediana e intervalo interquartil (percentil25 a percentil75).

(2) Média com desvio padrão.

Utilizando-se o coeficiente de correlação de Spearman, para analisar a correlação entre a variável grau com a Ki-67, p53 e idade; e também as variáveis Ki-67 e p53, somente as variáveis grau e Ki-67 apresentaram uma correlação significativa.

#### 4.7 IDADE E SEXO

A relação entre a idade e imunopositividade p53 está apresentada na tabela 4.

TABELA 4 - RELAÇÃO ENTRE p53 E IDADE

p53	Número de casos	Média de idade em anos
Positivo	14 (29,79%)	45
Negativo	33 (70,21%)	48

FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.

A relação entre sexo e imunomarcacão p53 está apresentada na tabela 5. Os resultados não foram estatisticamente significativos.

TABELA 5 - RELAÇÃO ENTRE p53 E SEXO

Sexo	Casos	Positivos (%)
------	-------	---------------

Masculino	23	8 (34,78%)
Feminino	24	6 (25%)

FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.

A relação entre Ki-67 e idade está apresentada na tabela 6.

TABELA 6 - RELAÇÃO ENTRE Ki-67 E IDADE

Ki-67	Casos	Média da idade em anos
Presente	37 (78,72%)	39
Ausente	10 (21,28%)	48

FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.

A relação entre Ki-67 e sexo está na tabela 7.

TABELA 7 - RELAÇÃO ENTRE Ki-67 E SEXO

Sexo	Casos	Ki-67 positivo
Masculino	23	18 (78,26%)
Feminino	24	19 (79,16%)

FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.

Controlando por sexo e idade do paciente, bem como por grau, a *odds ratio* para a presença ou não de p53 e de Ki-67 (Tabelas 8 e 9 – apêndice) não foi significativa.

Em relação ao sexo, as variantes possuíram distribuição semelhante ( $P=0,31$ ). Também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na distribuição do Ki-67 ( $P=0,94$ ) e da p53 ( $P=0,28$ ) quanto à idade.

#### 4.8 RESULTADO DA DISTRIBUIÇÃO GERAL DOS DADOS COMPUTADOS.

O resultado da distribuição geral dos dados computados está na tabela 10 (apêndice).



## 5 DISCUSSÃO

As neoplasias astrocitárias, responsáveis por alta taxa de óbito, correspondem a 60% das neoplasias primárias do Sistema Nervoso Central em adultos (KLEIHUES; CAVENEE, 2000), sendo, em 1999, a causa de morte em aproximadamente 13.100 pessoas somente nos Estados Unidos, onde a *American Cancer Society* estimou o diagnóstico de 16.800 novos tumores intracranianos, mais do que o dobro da Doença de Hodgkin e mais que a metade dos casos de melanoma (LANDIS et al., 1999). No Brasil, a taxa bruta de mortalidade por câncer de encéfalo, por 100.000 homens e 100.000 mulheres, entre 1995 e 1999, foi de 138 (BRASIL, Ministério da Saúde, 2004) Logo, o estudo da carcinogênese dessas neoplasias é de grande importância.

A carcinogênese é um processo multifatorial resultante do acúmulo de mudanças excitatórias ou inibitórias nas cascatas bioquímicas que alteram o comportamento proliferativo de uma célula. Este processo ocorre principalmente devido a mutações nos genes supressores de tumor (MILNER; MEDCALF, 1991).

O interesse do gene supressor de tumor p53 como evento chave do controle do ciclo celular deve-se à sua superexpressão em mais de 8000 neoplasias (MOLL; SCHRAM, 1998), entretanto, essa refere-se à forma mutante da proteína p53, que é aquela incapaz de exercer as funções de controle tumoral. Por outro lado, a forma selvagem desta molécula sofre rápida degradação devido a sua curta meia-vida (cinco minutos, em média), não sendo, conseqüentemente, detectada nos exames de imunohistoquímica. (MAY; MAY, 1999). A técnica utilizada neste estudo permitiu detectar a presença da proteína p53 mutada.

Baseando-se nos eixos de delineamento desta pesquisa, a montagem foi condicionada pelo desfecho. O eixo desfecho foi estático. O eixo experimentação foi observacional. O eixo comparação foi do tipo não comparado. O eixo unidade de pesquisa foi individual e o eixo temporalidade foi contemporâneo. Esses eixos de delineamento classificaram a pesquisa realizada como estudo transversal não

controlado, ou seja, estudo de prevalência, onde o fator em estudo foram os “tumores” e o desfecho foi a “medição” do Ki-67 e da p53 (FLETCHER; FLETCHER; WAGNER, 1989; JEKEL; ELMORE; KRATZ, 1999; ISOLAN, 2001; MOTTA; WAGNER, 2003).

Na análise estatística, apesar de as variáveis serem quantitativas, os dados não apresentaram uma distribuição normal, ou seja, comportaram-se com assimetria. Por este motivo, não foram utilizados o Coeficiente de Correlação de Pearson e o Teste *t* para amostras independentes.

## 5.1 Ki-67 E IMUNOHISTOQUÍMICA

As células que não estão em G0 têm sua atividade proliferativa mensurada de maneira mais acurada pela presença e quantificação do antígeno Ki-67 contido no núcleo celular, o qual foi identificado neste estudo pelo uso do anticorpo MIB-1 (MIB-1, DAKO, diluição 1:500) (HOSHINO; WILSON, 1979; SIMMONS et al., 2001).

O antígeno Ki-67 está presente em todas as fases do ciclo celular com exceção de G0, sendo que sua identificação pela imunopositividade ao reagir com o anticorpo MIB-1 reflete a capacidade proliferativa do tumor (SCHOLZEN; GERDES, 2000).

Nesta pesquisa foi selecionada, dentre as técnicas de biologia molecular para identificação de fatores de proliferação celular, a imunohistoquímica com o anticorpo MIB-1 para detecção do Ki-67, que é mais acurada quando comparada à identificação de outros antígenos (SCHOLZEN; GERDES, 2000).

Recentemente, BULLWINKEL et al., (2004), estudaram a proteína Ki-67 com o anticorpo monoclonal TUBB-9 e concluíram, pela primeira vez na literatura, que, em relação à fisiologia do Ki-67, este está presente também durante a transcrição do RNA.



O fato de este estudo não apresentar imunomarcção celular de fundo, ou seja, apenas o núcleo celular foi evidenciado nos casos positivos, atesta a qualidade técnica em que o procedimento foi realizado (GIOVANINI, 2001).

Alguns autores têm quantificado as células imunomarcadas com programas de análise de imagem (MONTINE et al., 1994; HOPF et al., 1994), alegando que este método é mais preciso na reprodução dos resultados, principalmente em tumores heterogêneos. Além disso, calcula a área do núcleo celular, ao invés do seu número. Isso impede que o fragmento de um núcleo seja somado como novo núcleo. Estes estudos corroboram o método de análise de imagem utilizado nesta tese.

Justifica também o uso do anticorpo MIB-1 neste estudo o fato de outros anticorpos terem sido usados para detecção do Ki-67 em tumores emblocados em parafina, não demonstrando superioridade sobre o MIB-1. TORP (1997), por exemplo, analisou 11 GBMs com os anticorpos monoclonais MIB-1e NC-MM1 e com os anticorpos policlonais NC-Ki-67p e rahKi-67 e observou que todos têm inumomarcção no núcleo, entretanto não houve concordância total entre os anticorpos. No entanto mesmo autor, em recente estudo (TORP; ALSAKER, 2002), analisou estes diferentes anticorpos em 22 pacientes com astrocitomas fibrilares grau II e verificou que o único anticorpo que teve relação com o prognóstico foi o MIB-1.

O estudo do MIB-1 nas 47 neoplasias astrocitárias foi realizado mediante titulação a partir de um controle de câncer de mama diagnosticado como alto grau de malignidade e com intensa marcação Ki-67 a uma diluição de 1:500.

## 5.2 p53 E IMUNOHISTOQUÍMICA

O estudo investigou o produto mutado do gene supressor de tumor p53 com técnica de imunohistoquímica. De uma forma geral, uma variedade de técnicas de biologia molecular, tais como *southern blotting*, Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e hibridização *in situ* (FISH), têm sido utilizadas para identificar anormalidades

no gene p53 e no cromossomo em que esse está inserido nos astrocitomas (LITOFISKY; RECHT, 1997). As vantagens do uso da imunohistoquímica são o baixo custo e a rapidez da técnica, além disso, a tendência atual é ter seu uso empregado como rotina nos laboratórios de anatomia patológica por ser de mais fácil acesso quando comparada com outras metodologias (GIOVANINI, 2001).

O gene supressor de tumor p53 sintetiza uma proteína de mesmo nome que participa da apoptose e inibe a proliferação celular tumoral ao atuar sobre o complexo CDK4/ciclina, inativando-o. A inativação altera a proteína p53, mutando-a. A p53 mutada tem a meia-vida aumentada. Devido a este fenômeno foi essa proteína alterada (mutada), e não aquela que exerce sua função normalmente (selvagem), que foi detectada nos casos estudados.

Para imunodeteção da p53 o autor utilizou o clone DO7, o qual se refere ao isótopo humano IgG2b, que reconhece a porção dos aminoácidos 21 a 25 da porção N-terminal da proteína. Esse anticorpo, segundo XIE et al<sup>4</sup>. (1999), citado por GIOVANINI (2001), é superior a outros por reconhecer uma área da p53 que sofre rara mutação.

Conforme WESTER et al. (2000) alguns processos técnicos podem interferir no resultado da imunomarcação. O antígeno, por exemplo, pode ser perdido a partir do momento da coleta do material cirúrgico. Além disso, os métodos utilizados para recuperação antigênica podem revelar algumas alterações na veracidade dos resultados. Com o objetivo de minimizar estes fatores na recuperação do antígeno, o autor usou banho-maria a 95% em solução de ácido cítrico a 10 mM, tendo esse método melhor controle na evidenciação dos epítomos, de acordo com GIOVANINI (2001). O estudo da p53 nas 47 neoplasias astrocitárias foi realizado mediante titulação a partir de um controle de câncer de mama diagnosticado como alto grau de malignidade e com intensa marcação p53 a uma diluição de 1:50 (GIOVANINI, 2001).

4. XIE, J.; FANG, W.; HUI, P. Specific point-mutate p53 mini-gene transfeting effects on biological behaviors of a human câncer cell line PG derived from human pulmonary giant carcinoma. *Zhonghua Yi Xue Zi Zhi*, n. 79, v. 1, p. 57-60, jan. 1999.

### 5.3 DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO

A divisão em graus foi baseada nos quatro critérios utilizados pela OMS, que são atipia nuclear, mitoses, proliferação vascular e necrose (KLEIHUES; BURGER; SCHEITHAUER, 1993; TATTER, 2003). Neste estudo, na fase de revisão histológica, além dos critérios utilizados pela OMS, o autor atentou para outros aspectos que auxiliam a classificação por graus das neoplasias astrocitárias, discutidas a seguir.

Em termos práticos, a presença de necrose em uma neoplasia astrocitária difusa maligna qualificou o tumor como grau IV (BURGER; SCHEITHANEUER, 1994). Microcistos podem estar presentes em alguns astrocitomas anaplásicos. Nesses casos, o diagnóstico de astrocitoma anaplásico foi cauteloso, visto que essas estruturas são comuns em astrocitomas de baixo grau de malignidade. Alguns astrocitomas anaplásicos tinham um pronunciado componente gemistocítico acompanhado por pequenas células hipercromáticas “em cacho” ou dispersas. Embora essas células astrocitárias tenham maior potencial para progressão maligna, a citologia gemistocítica isolada não foi suficiente para diagnosticar astrocitoma anaplásico (KROUWER et al., 1991).

Em relação à amostra dos tumores, os estudos de NELSON, TSUKADA e SCHOENFELD (1983), BURGER e SCHEITHANEUER (1994) e KLEIHUES e CAVENEE (2000) corroboraram o alto número de tumores grau IV estudados pelo autor. Além disso, em relação a variante histológica, o pequeno número de astrocitomas do tipo gemistocítico concordou com as pesquisas de WATANABE et al. (1997), VITAL et al. (1998) e KOSEL, SCHEITHAUER e GRAEBER (2001).

A variante histológica gemistocítica, de acordo com a classificação proposta pela OMS em 1993, refere-se a uma classificação dos astrocitomas grau II. O autor, entretanto, considerou variante histológica gemistocítica os tumores contendo, pelo menos, 20% de células deste tipo, independentemente do grau histológico, o que encontra suporte na literatura (MARTINS et al., 2003)

#### 5.4 GRAU HISTOLÓGICO E Ki-67

Utilizou-se o Coeficiente de Correlação de Spearman para analisar a correlação entre grau e Ki-67, havendo relação estatisticamente significativa, tanto quando se dividiu a variável Ki-67 em ausente e presente, como quando se dividiu em ausente, <5% e >5%. Corroborando esse estudo, outros autores apresentaram resultados semelhantes (ZUBER et al.,1988; JAROS et al., 1992; MONTINE et al.,1994; ELLISON et al., 1995; WAKIMOTO et al., 1996; CUNNINGHAM et al., 1997; MATSUMOTO et al., 1998; MCKEEVER et al.,1998; HARA et al., 2001; KAYASELCUK et al.,2002; ARAÚJO, 2003).

Dentre os artigos nos quais o Ki-67 foi o principal fator em estudo destaca-se o de ZUBER, HAMOU e DE TRIBOLET (1988), que analisaram o Ki-67 com anticorpo monoclonal em 51 gliomas, evidenciando relação entre grau de malignidade e Ki-67. Da mesma forma, MONTINE et al. (1994) encontraram resultados semelhantes ao estudarem 36 pacientes com neoplasias astrocitárias .

Embora WAKIMOTO et al. (1996), estudando a proteína Ki-67 com o anticorpo MIB-1 em 72 astrocitomas supratentoriais encontrassem índice de Ki-67 proporcional ao grau da neoplasia astrocitária, a porcentagem de células marcadas não foram concordantes com as encontradas na população investigada pelo autor.

Como mencionado, a imunorreação da proteína Ki-67 nos pacientes com neoplasias grau II não foi em nenhum caso superior a 5% das células tumorais, justificando o fato de estes tumores não terem alto grau de proliferação celular, o que condiz com seu comportamento biológico mais benigno. No entanto, McKEEVER et al. (1998) demonstraram a importância da mensuração do Ki-67 ao dividir uma amostra de pacientes com astrocitomas grau II em índice de proliferação celular menor ou igual a 2% (22 pacientes) e maior que 2% (28 pacientes). Utilizando o anticorpo MIB-1, estes autores verificaram pior prognóstico nos pacientes do segundo grupo.

Os estudos relatados acima tiveram em seu método o anticorpo monoclonal MIB-1 empregado, o qual foi o mesmo utilizado pelo autor. Esse anticorpo mensura

a atividade proliferativa de maneira mais acurada, quando comparado a outros anticorpos, pela presença e quantificação do antígeno Ki-67 contido no núcleo celular (HOSHINO; WILSON, 1979; SIMMONS et al., 2001).

No que diz respeito a outros anticorpos utilizados na detecção da proteína Ki-67, TORP (2002) estudou 41 neoplasias astrocitárias distribuídas em 22 astrocitomas grau II fibrilares, dez astrocitomas anaplásicos e nove GBMs, e investigou quatro diferentes anticorpos para o Ki-67 nesses tumores e sua relação com grau histológico e prognóstico. Na análise dos resultados, houve correlação entre o índice de proliferação nos quatro anticorpos e entre os astrocitomas de baixo grau (II) e de alto grau (III e IV).

Em nosso meio, ARAÚJO (2003) estudou a proteína do gene p53 e do EGFR na gênese e prognóstico de 45 pacientes portadores de GBM. A proteína ki-67 foi mensurada nestes tumores através do anticorpo MIB-1, estando expressa em 93% dos casos. Os resultados encontrados são concordantes com o deste estudo, no qual nos GBMs estudados, a proteína Ki-67 esteve presente em 24 dos 26 tumores.

## 5.5 GRAU HISTOLÓGICO E p53

O gene supressor de tumor p53 codifica uma proteína de mesmo nome, cuja ação reguladora sobre o ciclo celular dá-se por transcrição sobre a p21, que inibe o complexo CDK4/ciclina, impedindo a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular. Além disso, esta proteína regula a apoptose das células que sofreram dano ao seu DNA (YONISH-ROUACH, 1997).

Neste estudo, os tumores imunomarcados com p53 corresponderam a 29,8 % da amostra, sendo a maior parte correspondente ao grau IV, seguido pelos graus I e II e, por último, pelo grau III. Estudos prévios (FULTS et al., 1992; SINDRASKI et al., 1992) observaram resultados semelhantes em relação a essa distribuição, sugerindo que a inativação da p53 representa um evento genético precoce. Visto que a maioria dos tumores grau IV são oriundos da malignização de tumores de menor grau, a

presença da p53 mutada nesses últimos indica que esta via molecular está envolvida no desencadeamento desta doença. Os resultados obtidos por outros autores, descritos a seguir, reforçam estes achados.

VON DEIMLING et al., (1992), por exemplo, pesquisaram o gene p53 em 22 astrocitomas graus II e III (OMS) e observaram mutações em três dos oito tumores grau II e em quatro dos 14 grau III, concluindo que mutações neste gene não são restritas somente aos GBMs, mas também as neoplasias de menor grau de malignidade, achados que são consistentes com a afirmação de que alterações na via p53 são um evento genético precoce na gênese desta patologia. Estes dados alicerçam os resultados deste estudo, uma vez que, embora o GBM apresente maior prevalência deste tipo de mutação, os tumores de menor grau também a apresentam. Com relação às neoplasias astrocitárias grau III, todavia, não há uma explicação alicerçada em hipóteses biológicas que justifiquem a menor presença da p53 mutada, devendo ser levado em conta que o pequeno número destes tumores na amostra estudada pode levar a um viés estatístico (FLETCHER; FLETCHER; WAGNER, 1989; JEKEL; ELMORE; KRATZ, 1999; ISOLAN, 2001).

LOUIS et al. (1993), pesquisando com a técnica de imunohistoquímica e utilizando o anticorpo PAb 1801, observaram mutação da p53 em 17 astrocitomas em uma amostra de 34 neoplasias astrocitárias, sendo que destes tumores, oito eram grau II, 12 grau III e 14 grau IV. Além destes resultados, observou-se intensidade de imunomarcção maior nos tumores de grau IV. Esses resultados corroboram os desta amostra porque, apesar das mutações nos tumores grau III estarem presentes em porcentagem menor, o GBM foi o que mais esteve associado a mutações da p53.

Outro artigo que concorda com este estudo é o de LOUIS e CAVENEE (2003) que, ao revisarem a biologia molecular dos tumores do SNC, observaram que alterações no gene p53 estão presentes em estágios precoces da tumorigênese dos astrocitomas em aproximadamente 30% dos casos, sugerindo que a inativação desta molécula é importante na formação de tumores de baixo grau.

Por outro lado, a porcentagem de tumores graus III e IV imunomarcados pela p53, no presente estudo, foi menor que estudos anteriores (BRUNER et al., 1991;

NEWCOMB et al., 1993). Além destes, outros artigos concordam com esta discrepância. BARBARESCHI, LUZZOLINO e PENNELLA, (1992) demonstraram a expressão da proteína p53 em 35 de 86 tumores cerebrais, sendo que no grupo dos astrocitomas, os resultados foram oito casos positivos de 15 astrocitomas de baixo grau, seis de dez astrocitomas anaplásicos e 12 de 21 GBMs. Dos seis astrocitomas pilocíticos, nenhum expressou reação antígeno-anticorpo.

Substanciando estas informações, ELLISON et al. (1992) analisaram 64 neoplasias astrocitárias que foram classificadas em astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico e GBM com o emprego de imunohistoquímica. Nesta técnica foram utilizados três anticorpos monoclonais (pAb1801, pAb240 e pAb421) e dois policlonais (CM1 e C19). Considerando-se todos os anticorpos, a imunopositividade foi detectada em três dos 16 astrocitomas difusos, oito dos 14 astrocitomas anaplásicos e 24 dos 34 GBMs. No entanto, em relação ao anticorpo pAb 1801, a imunomarcção esteve presente em três dos 16 astrocitomas difusos, seis dos 14 astrocitomas anaplásicos e 12 dos 34 GBMs. Esses números são maiores que os encontrados nesta pesquisa, porém, a metodologia quanto ao tipo de anticorpos utilizados diferiu da empregada nesta tese.

VITAL et al. (1998) avaliaram a expressão da proteína p53 utilizando o anticorpo monoclonal DO-7 (DAKO) com a técnica de imunohistoquímica em 100 astrocitomas grau II. Identificaram imunopositividade em 72 casos, sendo que a porcentagem de células imunomarcadas foi menor do que 5% em 19 casos, entre 5% e 50% em 46 casos e em mais de 50% em sete casos. Embora estes resultados sejam discrepantes com os encontrados pelo autor, eles corroboram o envolvimento precoce desta proteína na gênese destes tumores. Existem, no entanto, algumas explicações para esta discrepância, que serão discutidas a seguir.

Inicialmente deve-se considerar o fato de que vários fatores estão envolvidos na detecção da p53 por imunohistoquímica, entre eles, quantidade do antígeno, afinidade com o anticorpo, concentração deste, duração das encubações, sensibilidade do sistema de detecção e fixação (HALL; LANE, 1994). Além disso, existem três fenômenos principais responsáveis em alguns casos por detecção da p53 por imunohistoquímica, sem que haja alterações no gene p53 ou no

cromossomo 17 quando o estudo é realizado com as técnicas de PCR ou FISH, respectivamente. A seguir, serão considerados cada um deles.

Em primeiro lugar, pode-se dizer que a imunohistoquímica para detecção da p53 tem alta sensibilidade, mas nem tanta especificidade porque células positivas para p53 não estão mutadas em 10% a 29% dos casos quando analisadas por outras técnicas que estudam a mutação gênica ou deleção cromossômica específica (LOUIS et al., 1993; LITOFISKY; RECHT, 1997). Essa discordância pode ser devido à estabilização da p53 selvagem por mecanismos ainda não elucidados completamente. Postula-se que lesão celular, resposta fisiológica à lesão no DNA, proliferação celular desregulada ou outros mecanismos que alterem a fisiologia da célula podem prolongar a meia-vida da proteína p53 selvagem, a qual irá se evidenciar positivamente na imunohistoquímica, mesmo sem estar mutada (NEWCOMB et al., 1989; RUBIO et al., 1993; LOUIS et al., 1993; HALL; LANE 1994; WATANABE et al., 1997).

Similar a este mecanismo, a acumulação da proteína não mutante nas células neoplásicas pode ser devido à sua estabilização e inativação pelo produto do gene MDM2, principalmente quando este se encontra amplificado, formando o complexo MDM2/p53, o qual não é degradado pela enzima específica que degrada a p53 (HALL; LANE, 1994). Como resultado, tem-se detecção da proteína p53 na imunohistoquímica sem que esta esteja mutada.

Uma terceira forma é a estabilização da p53 selvagem mediante formação de complexos com proteínas virais, cuja ligação com o genoma viral SV40, apenas a título de ilustração, foi a responsável pela descoberta da p53 (HALL; LANE, 1994). Neste caso, a meia-vida da proteína selvagem também aumenta, sendo detectada pela imunohistoquímica, mesmo não estando mutada.

Em suma, deduz-se que a imunopositividade pode não representar apenas um marcador de mutação gênica, mas refletir de forma mais abrangente outras anormalidades nas vias de sinalização do complexo ciclo que envolve a p53, as quais contribuiriam da mesma forma para seu prejuízo funcional (ARAÚJO, 2003).



Cabe ressaltar, finalmente, que além da via p53 existem outras vias genéticas na tumorigênese das neoplasias astrocitárias (WATANABE et al., 1996; DE ANGELIS, 2001).

Outro aspecto essencial a ser discutido é o conceito de que a expressão da p53 pode ser diferente em diferentes populações, dependendo da área geográfica estudada, o que acontece por existirem diversos fatores mutagênicos ambientais em variadas regiões do mundo (SHIELDS; HARRIS, 1991). Com base nesta definição, DAS et al. (2002), realizaram estudo genético na população asiática com GBM porque a incidência desta neoplasia na população de Cingapura era de somente 25% das neoplasias primárias do sistema nervoso central, sendo menor que a porcentagem de 40-60% relatada na literatura mundial. Nesse estudo, em que foram analisados o EGFR, MDM-2, PDGRF-ALFA, proteína p53 e gene p53 em 39 pacientes asiáticos portadores de GBM, os resultados sugeriram que ambas as vias genéticas (tanto do GBM primário quanto do secundário) estavam presentes na maioria dos tumores, sugerindo que os modelos de carcinogênese do GBM diferem na população asiática. Além disso, foram evidenciadas três mutações no gene p53 ainda não relatadas no GBM. Não há referência na literatura, com exceção de ARAÚJO (2003), acerca de estudos envolvendo a p53 em neoplasias astrocitárias oriundas de uma população da região sul do Brasil. Considerando o aspecto geográfico, os 47 tumores analisados nos pacientes desta tese somam um importante número com a casuística de ARAÚJO (2003).

Dentre os tumores imunomarcados que demonstraram alta quantificação de marcação (3+ ou 4+), todos os casos foram grau IV. Esses achados são corroborados por outros estudos (BRUNER et al., 1991; BARBARESCHI; LUZZOLINO; PENNELLA, 1992; ELLISON et al., 1992; LOUIS et al., 1993; NEWCOMB et al., 1993; VITAL et al., 1998). Vários padrões de imunomarcação da p53 têm sido definidos. De uma maneira geral, em alguns tumores, a maioria das células mostra superexpressão mediante intensa marcação imunohistoquímica, enquanto em outras, essa é menor. Estes diferentes fenótipos têm distintas bases biológicas porque células tumorais esporadicamente positivas podem não se correlacionarem com uma óbvia anormalidade molecular na via p53, representando, muitas vezes, a forma selvagem acumulada em resposta a erros genéticos

espontâneos freqüentemente presentes em neoplasias. Ao contrário, a presença de forte imunomarcção na maioria das células é freqüentemente associada com mutação no gene (HALL; LANE, 1994).

## 5.6 VARIANTE HISTOLÓGICA E Ki-67

No diz respeito aos estudos discutidos em que foram abordadas as relações entre grau de malignidade e Ki-67, a maioria é referente à variante histológica do tipo fibrilar, não sendo realizada correlação com as outras variantes (ZUBER; HAMOU; DE TRIBOLET, 1988; JAROS et al., 1992; MONTINE et al., 1994; ELLISON et al., 1995; WAKIMOTO et al., 1996; MATSUMOTO et al., 1998; MCKEEVER et al., 1998; HARA et al., 2001; KAYASELCUK et al., 2002; ARAÚJO, 2003).

CUNNINGHAM et al. (1997), por outro lado, estudaram a expressão da proteína p53, MIB-1 (Ki-67) e PCNA em 105 astrocitomas e 15 oligoastrocitomas. De 104 pacientes, 87% apresentaram marcação pelo MIB-1 e sua intensidade foi proporcional ao grau histológico, porém, não teve relação com a variante histológica; achados que não concordam com os encontrados pelo autor.

Embora seja perigoso estabelecer uma significância estatística devido ao n ser menor do que 10 (MOTTA; WAGNER, 2003) nos seis casos de neoplasias gemistocíticas apresentadas pelo autor, todos os casos foram imunomarcados.

Em relação aos astrocitomas pilocíticos, BOWERS et al. (2003) estudaram o Ki-67 em 141 pacientes pediátricos, sendo que em 118 a imunorreatividade esteve presente, dados que não corroboram os quatro casos de neoplasias pilocíticas deste estudo, dos quais somente um (caso 1) apresentou 19 células imunorreativas dentre 1000 células analisadas. Novamente, deve-se ter cautela nesta análise devido ao pequeno número de casos.

PRAYSON e ESTES (1996) analisaram a expressão da p53 e Ki-67 em 18 astrocitomas de variante histológica protoplasmática, sendo que 28% expressaram a

proteína p53 e nenhum tumor expressou imunomarcação para Ki-67 (MIB-1). Esses resultados corroboram as observações clínicas compatíveis com tumor de crescimento lento. Nesta amostragem não houve nenhum caso de astrocitoma com variante protoplasmática.

## 5.7 VARIANTE HISTOLÓGICA E p53

Os tumores gemistocíticos apresentaram imunomarcação para p53 em metade dos casos, sendo a variante que mais se correlacionou com essa mutação. Concordam com esses achados estudos prévios que correlacionaram prevalência de astrócitos gemistocíticos e p53 (WATANABE et al., 1997; KOSEL et al., 2001), com exceção do estudo de MARTINS et al. (2001). WATANABE et al. (1997) concluíram que astrocitomas de baixo grau com componente gemistocítico, além de apresentarem imunopositividade para p53 mais freqüente do que em outras variáveis histológicas, progridem mais rapidamente para malignidade. Um estudo (VITAL et al., 1998) analisou com imunohistoquímica 100 astrocitomas grau II, sendo que destes, dez foram classificados como gemistocíticos. Destes últimos, todos foram imunomarcados pela p53.

MARTINS et al. (2001), por outro lado, analisaram a proteína p53 em 22 tumores distribuídos nos graus II e III do tipo gemistocítico. O critério para classificar a neoplasia como gemistocítica foi a presença de pelo menos 20 % do conteúdo tumoral corresponder a este tipo celular. Este cálculo foi realizado a partir da razão paramétrica entre o número de gemistocitos e o número de células neoplásicas contadas, sendo estas no mínimo 1000. O mesmo método foi utilizado nesta pesquisa. Encontraram-se apenas sete casos positivos para p53. Um fato importante neste estudo é que, além destes sete tumores, outros cinco apresentavam imunomarcação para a proteína. Entretanto, nestes, a reação somente foi observada nas células que não eram gemistocíticas, não sendo estes tumores considerados, por extensão, como imunopositivos para esta variante histológica. Cabe ressaltar

que nos seis astrocitomas gemistocíticos estudados pelo autor, a imunomarcacão esteve presente nas próprias células gemistocíticas em todos.

YANG et al. (2003), estudando o significado das células gemistocíticas nos astrocitomas, não encontraram relação entre as neoplasias contendo mais de 20% de células gemistocíticas e o prognóstico, porém esta esteve presente quando consideradas as variáveis Ki-67 e anaplasia com prognóstico. Embora nesta tese o prognóstico não tenha sido avaliado, os resultados com significância estatística (correlação de grau histológico e Ki-67) concordam, indiretamente, com os de YANG et al., uma vez que maior grau de malignidade está associado significativamente a pior prognóstico (KLEIHUES; CAVENEE, 2000).

A variante histológica que menos se correlacionou com mutação na p53 nesse estudo foi a pilocítica. Estes resultados são corroborados pelos trabalhos de ISHII et al. (1998), HAAPASATO et al. (1999), HAYES et al. (1999) e CHENG et al. (2000), os quais constataram que mutações na p53 nos astrocitomas pilocíticos são raras.

Outros estudos também enfatizam esta pequena associação, concordando com os resultados encontrados pelo autor nos astrocitomas pilocíticos. Na série de 86 neoplasias cerebrais de BARBARESCHI, LUZZOLINO e PENNELLA (1992), por exemplo, seis apresentavam esta variante histológica. Destes, nenhum foi imunopositivo para p53 com o uso do clone PAb 1801. Da mesma forma, PATT et al. (1996), estudando mutação no gene p53, verificaram sua presença em somente um astrocitoma pilocítico de um grupo de seis.

Ainda em relação aos astrocitomas de baixo grau de malignidade, MUNOZ et al. (1996) e PAULUS et al. (1996) concluíram resultados semelhantes ao analisarem 14 xantoastrocitomas pleomórficos: na soma das duas séries, somente três casos foram positivos para p53, sendo a mesma metodologia empregada em ambas. Esses achados podem ser úteis para um diagnóstico diferencial molecular nas neoplasias astrocitárias (GIOVANINI, 2001). KAULICH et al., (2002) estudaram as alterações genéticas em 62 xantoastrocitomas pleomórficos e encontraram mutação no gene p53 em somente três casos. Na amostra estudada pelo autor, nenhum astrocitoma era do tipo xantoastrocitoma pleomórfico.

## 5.8 Ki-67 e p53

Na análise estatística que comparou Ki-67 com p53, mesmo com o uso da regressão logística, não houve correlação entre estas variáveis. Dois estudos corroboram esta informação (KORDEK et al., 1996; CUNNINGHAM et al., 1997; SARKAR, et al., 2003), enquanto dois a contestam-na (JAROS et al., 1992; SARKAR et al., 2003)

Primeiramente, KORDEK et al. (1996) compararam a expressão da proteína p53 com Ki-67 e PCNA em nove astrocitomas pilocíticos, 12 astrocitomas grau II, nove grau III e 30 grau IV. Em relação à proteína p53 foram imunomarcados, respectivamente, 0%, 41,7%, 33,3% e 53,3%. Estas porcentagens foram confrontadas estatisticamente com Ki-67 e PCNA, não havendo significância estatística.

Outro artigo que não encontrou correlação e, dessa forma, concordou com os resultados deste estudo foi o de CUNNINGHAM et al. (1997), que estudaram a expressão das proteínas p53, MIB-1 e PCNA em 105 astrocitomas e 15 oligoastrocitomas. Em relação a 102 pacientes, 85% evidenciaram imunomarcação para p53, não havendo associação com idade, sexo ou grau tumoral. De 104 pacientes, 87% apresentaram marcação pelo MIB-1 e sua intensidade foi proporcional ao grau histológico. Entretanto, quando foram correlacionadas estatisticamente as diferentes variáveis imunohistoquímicas, o coeficiente de correlação foi próximo de zero.

Por outro lado, SARKAR et al. (2003), analisando a perda da heterozigose (LOH) do cromossomo 17, o gene p53, a proteína p53 e o MIB-1 em neoplasias astrocitárias de alto e baixo grau encontraram forte associação entre LOH do cromossomo 17 e proteína p53 mutada com MIB-1. Não houve associação, entretanto, estatisticamente significativa entre MIB-1 e mutação do gene p53.

JAROS et al. (1992), estudando 43 astrocitomas, acharam correlação entre Ki-67 e p53 com significância estatística.

Outros estudos analisaram Ki-67 e p53, porém, ao invés de correlacionarem estas variáveis entre si, correlacionaram-nas com a gênese e o prognóstico tumorais (JAROS et al., 1992; PRAYSON; ESTES, 1996; MATSUMOTO et al., 1998; HILTON et al., 1998; TIHAN et al., 2000; GIL-SALU et al., 2001; REAVEY-CANTWELL et al., 2001; HARA et al., 2001; ARAÚJO, 2003). Embora nestes trabalhos não tenha sido realizada análise estatística entre Ki-67 e p53, estas proteínas foram estudadas simultaneamente na amostra. A discussão destes encontra-se a seguir.

JAROS et al. (1992) estudaram, mediante técnica de imunohistoquímica, a expressão das proteínas p53, EGFR e Ki-67 em biópsias de 16 tipos de tumores cerebrais, sendo que destes, 43 eram astrocitomas. Observaram que a imunopositividade aumentava à medida que aumentava o grau de malignidade do tumor. Estes resultados foram concordantes com os encontrados pelo autor.

Concordando com os resultados obtidos nesta amostra, MATSUMOTO et al. (1998) analisaram 55 neoplasias astrocitárias, observando que as expressões do MIB-1 e p53 foram significativamente menores nos astrocitomas de baixo grau em relação aos de alto grau. Este autor observou a utilidade destes marcadores no diagnóstico diferencial entre os diferentes graus de malignidade, quando associados a outras variáveis.

A modalidade cirúrgica utilizada na obtenção da amostra de TIHAN et al. (2000), que pesquisaram a expressão das proteínas p53 e Ki-67 em material proveniente de biópsias extereotáxicas de neoplasias astrocitárias, difere deste estudo, no qual todo material foi oriundo de ressecção cirúrgica. Considera-se que a biópsia possui acurácia diagnóstica inferior à ressecção cirúrgica em neoplasias astrocitárias, o que se explica devido à heterogeneidade destes tumores (BURGER; SCHEITHAUER, 1994). Independentemente da diferença dos métodos, estes autores observaram forte associação com pior prognóstico nos casos que apresentaram índices de imunomarcção do Ki-67 e p53 maiores que 15%. Estas variáveis, porém, não foram comparadas entre si.

Considerando que maior grau de malignidade está relacionado com pior prognóstico, REAVEY-CANTWELL et al. (2001), analisaram a relação da expressão da p53 e Ki-67, entre outras variáveis, com a sobrevida de 32 pacientes com GBM e observaram que, enquanto a proteína p53 não tem qualquer relação com o prognóstico, o Ki-67 tem forte associação. Em relação a este último, tais dados corroboram, indiretamente, este estudo, uma vez que foi evidenciada relação estatisticamente significativa entre Ki-67 e grau de malignidade.

HARA et al. (2001) comparou a perda ou redução do DCC com o Ki-67 e a p53 em 119 astrocitomas de diferentes graus de malignidade, verificando que a imunomarcação das proteínas p53 e Ki-67 aumentava conforme o grau de malignidade tumoral, de maneira semelhante descrita pelo autor, com exceção restrita à expressão da p53 nos tumores grau III.

ARAÚJO (2003) avaliou 45 pacientes com GBM, dividindo-os em dois grupos de acordo com a história clínica e encontrando relação entre p53 e EGFR com tempo de sobrevida menor, não sendo conferido valor prognóstico na determinação do Ki-67. Embora a presença da p53 mutada nos tumores grau IV deste estudo tenha sido maior que os outros graus, ela não encontrou proporcionalidade com o estudo de ARAÚJO (2003), onde esta proteína esteve presente na quase totalidade da amostra.

## 5.9 IDADE E SEXO

Estudos iniciais de astrocitomas em pacientes pediátricos encontraram menos p53 mutada em relação aos adultos (LITOFISKY; HINTON; RAFFEL, 1994). Todavia, estudos subseqüentes (LANG et al., 1994; SCHIFFER et al., 1995; POLLACK et al., 1997) não concordaram com estes achados. Recentemente, POLLACK et al. (2001), estudando astrocitomas de alto grau de malignidade, encontraram mutação da p53 em somente 11,8% das crianças com idade abaixo de três anos, enquanto que nos pacientes acima dessa idade, a porcentagem foi de 40%, uma diferença

estatisticamente significativa, evidenciando que a patogênese desse câncer nas crianças de mais idade é semelhante à dos adultos, enquanto que nas crianças menores de três anos, outra via molecular, provavelmente, é utilizada para o desenvolvimento tumoral.

LOUIS et al. (1993), analisando os resultados obtidos no estudo de 34 neoplasias astrocitárias, verificou que, mediante imunohistoquímica e PCR, a média de idade foi de 45,2 anos em pacientes sem mutações na p53 e de 31,8 anos para aqueles com mutação nesta molécula, sendo que esta diferença somente teve significância estatística ao serem considerados isoladamente os pacientes com GBM. Ao correlacionar os casos positivos, tanto na imunohistoquímica quanto na PCR, a média de idade foi de 40,5 anos para os casos positivos para p53 e 42,6 anos para os negativos. Estes resultados, excetuando-se a relação estatística entre GBM e idade, são corroborados pelos encontrados pelo autor.

VITAL et al. (1998) encontraram resultado discrepante com este estudo no que diz respeito à idade: dos pacientes com menos de 40 anos 76,2% dos tumores foram imuno-positivos; com menos de 45 anos, 76,8%; com menos de 50 anos, 74,6% e com mais de 50 anos, 64%. Embora sejam diferentes das observações do autor, fortalecem a hipótese de que outra via genética esteja envolvida em pacientes com mais idade, ou seja, aqueles que têm maior incidência de GBM primário.

STARK et al. (2003) estudaram 143 pacientes com GBM, que foram divididos em três grupos de acordo com a idade (menos de 40 anos, entre 40 e 60 anos e mais de 60 anos). Estes autores mensuraram as proteínas p53, mdm-2 e EGFR, sendo observado que a expressão da proteína p53 diminuiu conforme o aumento da idade de maneira estatisticamente significativa, enquanto as outras proteínas aumentaram sua expressão conforme aumento da idade dos pacientes. Estes achados discordam daqueles encontrados pelo autor, no quais não foram encontradas correlações estatisticamente significativas em nenhum dos testes realizados envolvendo a variável idade.

Embora a idade seja um importante fator prognóstico quando analisada isoladamente na sobrevida de pacientes portadores de neoplasias astrocitárias (HANEL, 2002), independentemente da relação entre as vias de carcinogênese



dependentes e independentes da p53 descritas, a proteína Ki-67 não tem sido estudada sistematicamente em relação a este fator, tampouco ao sexo. Isto se deve, provavelmente, a observações iniciais e ao fato de não haver hipótese biológica que corrobore o substrato teórico necessário para o desenvolvimento de estudos mais específicos relativos a este tema. Neste estudo transversal, o autor comparou estas variáveis, não encontrando correlação com significância estatística entre elas.

Com relação à proteína p53, por outro lado, a hipótese biológica existe em relação à idade, pois outras vias da carcinogênese estão envolvidas nas neoplasias astrocitárias de uma parcela dos pacientes menores de três anos de idade (POLLACK et al., 2001), bem como naqueles com mais de 60 anos de idade (KLEIHUES; CAVENEE, 2000), conforme descrito.

No que tange a p53, em relação ao sexo, não houve nesta casuística diferença estatisticamente significativa entre estas variáveis. Estes achados são semelhantes aos de KLEIHUES e CAVENEE (2000), bem como outras séries (BRUNER et al., 1991; BARBARESCHI; LUZZOLINO; PENNELLA, 1992; ELLISON et al., 1992; LOUIS et al., 1993; NEWCOMB et al., 1993; CHOZUCK et al., 1994; VITAL et al., 1998), as quais não demonstraram qualquer relação entre sexo e p53. Até o momento não existem resultados que contestem estas observações.

## 5.10 NOVAS PERSPECTIVAS

No Brasil, recentemente, novas linhas de pesquisa estão surgindo em relação à p53 e tumores cerebrais. Pesquisadores brasileiros, em estudo desenvolvido no Instituto Nacional do Câncer e Laboratório de Controle da Expressão Gênica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pesquisaram a proteína p53 e anticorpo anti-p53 séricos em 24 tumores cerebrais, sendo 20 neoplasias astrocitárias, e encontraram relação entre menor idade (16 anos ou menos) e presença de anticorpos anti-p53, com significância estatística. (FONSECA et al., 2003).

Atualmente, o p53 tem sido o principal gene estudado em gliomas, não somente em relação a comportamento biológico e prognóstico tumoral, mas também no que tange aos novos rumos no tratamento dos pacientes portadores desta patologia, tais como a terapia gênica. LANG et al., (2004), em estudo de fase 1, transferiram gene p53 mediado por adenovírus (Ad-p53) via injeção intratumoral por cateter com auxílio de estereotaxia em 50 pacientes, dos quais 20 se submeteram à ressecção tumoral em bloco, seguido de tratamento da cavidade tumoral com Ad-p53.. Estes tumores foram estudados e se verificou que a injeção intratumoral de Ad-p53 permitiu transferência exógena do gene p53 e expressão de proteína p53 não mutada, com conseqüente apoptose de células tumorais. Entretanto, isto ocorreu somente nas células adjacentes ao local da injeção. Um fator importante é que não houve evidências de disseminação sistêmica viral, tendo os autores concluído que uma importante meta é conseguir a distribuição do Ad-p53 em toda a extensão tumoral.

De uma maneira geral, técnicas de terapia gênica, em laboratório e em ensaios clínicos de fase 1 buscam introduzir nas células tumorais a proteína p53 normal (selvagem) mediante vetores, tais como retrovírus, adenovírus ou plasmídeos, na tentativa de corrigir anormalidades moleculares através da regularização fenotípica de células tumorais, incrementando a apoptose e estimulando a parada do ciclo celular destas células, bem como aumentando sua sensibilidade a quimioterápicos e radiação ionizante (ARAÚJO, 2003).

As informações contidas neste estudo fornecem informações importantes a respeito da carcinogênese de neoplasias astrocitárias de uma amostra da população da região sul do Brasil, podendo ser a base para novas pesquisas em nosso meio relacionadas não somente às vias moleculares envolvidas na gênese destes tumores, mas também aos aspectos de prognóstico, diagnóstico diferencial, resposta a terapias adjuvantes e, talvez, futuramente, novas modalidades terapêuticas baseadas em biologia molecular.

## 6 CONCLUSÕES

1. Ki-67 correlacionou-se com maior grau de malignidade com significância estatística.

2. p53 correlacionou-se com maior grau de malignidade, com exceção das neoplasias de grau III, sem significância estatística.

3. Ki-67 correlacionou-se, com significância estatística, com as variantes histológicas fibrilar e gemistocítica.

4. p53 correlacionou-se, sem significância estatística, com variantes histológicas fibrilar e gemistocítica.

5. Ki-67 e p53 não apresentaram correlação estatisticamente significativa.

6. Ki-67 e p53 não apresentaram correlação estatisticamente significativa com idade e sexo.

## REFERÊNCIAS

ALBRECHTSEN, N. et al. Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non activated p53. **Oncogene**, London, v.18, p.7706-7717, 1999.

ARAÚJO, J.C. **A proteína do gene p53 e do receptor do fator de crescimento epidérmico na gênese e prognóstico do glioblastoma**. Curitiba, 2003. 116 f. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

BANCROFT, J.D.; STEVENS, A. **Theory and practice of histological techniques**. New York: Churchill Livingstone, 1977.

BARBARESCHI, M.; LUZZOLINO, P; PENNELLA, A. p53 protein expression in central nervous system neoplasms. **J. Clin. Pathol.**, London, v.45, p.583-586, 1992.

BASERGA, R. Oncogene and the strategy of growth. **Cell**, Cambridge, v.79, p.927-939, 1994.

BIERNAT, W. et al. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, Lawrence, v.56, p.180-185, 1996.

BIRNER, P. et al. Prognostic relevance of p53 protein expression in glioblastoma. **Oncol. Rep.**, Athens, v.9, p.703-707, 2002.

BOWERS, D.C. et al. Study of the MIB-1 labeling index as a predictor of tumor progression in pilocytic astrocytomas in children and adolescents. **J. Clin. Oncol.** Philadelphia, v.21, p.2968-2973, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância – Conprev. **Atlas de mortalidade por câncer no Brasil 1979-1999** – Rio de Janeiro: INCA, 2002. disponível em <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 06 de junho de 2004.

BRAT, D.J. et al. Molecular genetic alteration in radiation-induced astrocytomas. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v.154, p.1431-1438, 1999.

BRAUN, N.; PAPADOPOULOS, T.; MÜLLER-HERMELINK. Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. **Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.**, Berlin, v.56, p.25-33, 1988.

BRENTANI, M.M. et al. **Bases da oncologia**. São Paulo: LEMAR, 1998.

BRUNER, J.M.; SAYA, H.; MOSER, R.P. Immunohistochemical detection of p53 in human gliomas. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v.4, p.671-674, 1991.

BRUNO, S.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. **Cell Prolif.**, Oxford, v.25, p.31-40, 1992.

BULLWINKELL, J. et al. **The intracellular localization of the Ki-67 protein as assessed with the novel monoclonal antibody TUBB-9 points to a role in ribosomal RNA transcription.** Disponível em <<http://www.med.miami.edu>> Acesso em 05 de jul. 2004.

BURGER, P.C.; SCHEITHAUER, B.W. Fascicle 10 - Tumors of the central nervous system. In: \_\_\_\_\_. **Atlas of tumor pathology.** Washington: Armed Forces Institute of Pathology, 1994.

CHENG, Y. et al. Pilocytic astrocytoma do not show most of the genetic changes commonly seen in diffuse astrocytomas. **Histopathology**, Oxford, v.37, p.437-444, 2000.

CHO, Y. et al. Crystal structure of a p53 tumor supressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. **Science**, Washington, v.265, p.346-355, 1994.

CHOZUCK, B.S. et al. Prognostic implications of p53 overexpression in supratentorial astrocytic tumors. **Neurosurgery**, Baltimore, v.35, p.831-837, 1994.

CHUNG, R. et al. TP53 mutation and 17p deletions in human astrocytomas. **Genes Chromossom. Cancer**, New York, v.3, p.323-331, 1991.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Neoplasia. In: \_\_\_\_\_. **Robbins – pathologic basis of disease.** 6. ed. Tokyo: Saunders, 1999.

CUNNINGHAM, J.M. et al. Analysis of proliferation and p53 expression in gliomas of astrocytic origin: relationships and prognostic value. **J. Neurosurg.**, Baltimore, v.86, p.21-30, 1997.

DARNTON, E. Demystified...p53. **Mol. Pathol.**, Baltimore, v.51, p.248-253, 1998.

DAUMAS-DUPORT, C.; SCHEITHAUER, B.W.; KELLY, P.J. A hystologic and cytologic method for the spatial definition of gliomas. **Mayo Clin. Proc.**, Rochester, v.62, p.635-649, 1987.

DAS, A. et al. Glioblastoma multiforme in an Asian population: evidence for distinct genetic pathway. **J. Neurooncol.**, Dordrecht, v.60, p.117-125, 2002.

DE ANGELIS, L.M. Brain tumor. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.344, p.114-123, 2001.

DIRKS, P.B.; RUTKA, J.T. Current concepts in neuro-oncology: the cell cycle – a review. **Neurosurgery**, Baltimore, v.40, p.1000-10013, 1997.

DU MANOIR, S. et al. Ki-67 labeling in postmitotic cells defines different Ki-67 pathways within the 2c compartment. **Cytometry**, New York, v.12, p.455-463, 1991.

ELLISON, D.W. et al. Expression of the p53 protein in a spectrum of astrocytic tumors. **J. Pathol.**, Chechester, v.168, p.383-386, 1992.

ELLISON, D.W. et al. Prognostic indicators in a range of astrocytic tumors: an immunohistochemical study with Ki-67 and p53 antibodies. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, London, v.59, p.413-419, 1995.

ENESTROM, S. et al. Ki-67 antigen expression as a prognostic factor in primary and recurrent astrocytomas. **Neurochirurgie**, Paris, v.44, p.25-30, 1998.

FARMER, G. et al. Wild-type p53 activates transcription *in vitro*. **Nature**, London, v.358, p.83-86, 1992.

FLETCHER, R.H.; FLETCHER, S.W.; WAGNER, E.H. **Epidemiologia clínica: bases científicas da conduta médica**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1989.

FONSECA, et al. Anti-P53 antibodies in brazilian brain tumor patients. **Genet. Mol. Res.**, New York, v.2, p.185-190, 2003.

FULTS, D. et al. p53 mutation and loss of heterozygosity on chromosome 17 and 10 during human astrocytic progression. **Cancer Res.**, Baltimore, v.42, p.674-679, 1992.

GERDES, J. et al. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen definid by monoclonal antibody Ki-67. **J. Immunol.**, Baltimore, v.133, p.1710-1715, 1984.

GIOVANINI, A.F. **Uso da técnica imunohistoquímica e PCR-SSCP para estudo do p53 em carcinomas epidermóides de boca**. São Paulo, 2001. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) - Universidade de São Paulo.

GIL-SALU, J.L. et al. Prognosis value of p53 gene and cellular proliferation factors in malignant supratentorial gliomas. **Neurocirurgia**, Astur, v.12, p.125-132, 2001.

HAAPASATO, H. et al. Clinicopathological correlation of cell proliferation, apoptosis and p53 in cerebellar pilocytic astrocytomas. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, Oxford, v.25, p.134-142, 1999.

HALL, P.A.; LANE, D.P. p53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry?- Revisited. **J. Pathol.**, Philadelphia, v.172, p.1-4, 1994.

HANEL, R.A. **Fatores prognósticos em glioblastomas**. Curitiba, 2002, 101 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

HARA, A. et al. Loss of DCC expression in astrocytomas: relation to p53 abnormalities, cell kinetics, and survival. **J. Clin. Pathol.**, London, v.54, p.860-865, 2001.

HARTWELL, L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. **Cell**, Cambridge, v.71, p.543-546, 1992.

HAYES, V.M. et al. High frequency of TP53 mutation in juvenile pilocytic astrocytoma indicates role of TP53 in the development of these tumors. **Brain Pathol.**, Zurich, v.9, p.463-467, 1999.

HEIDEBRECHT, H.J. et al. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the "Ki-67" proteins. **Cell Prolif.**, Oxford, v.29, p.413-425, 1996.

HERMANSON, M. et al. Association of loss of heterozygosity on chromosome 17p with high platelet derived growth factor alpha receptor expression in human malignant gliomas. **Cancer Res.**, Baltimore, v.56, p.164-171, 1996.

HILTON, D.A. et al. Accumulation of p53 and Ki-67 expression do not predict survival in patients with fibrillary astrocytomas or the response of these tumors to radiotherapy. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 42, p.724-729, 1998.

HOPF, N.J. et al. Image analysis of proliferating cells in tumors of the human nervous system: an immunohistological study with the monoclonal antibody Ki-67. **Neurosurgery**, Baltimore, v.35, p.917-923, 1994.

HOSHI, M. et al. Correlation between MIB-1 staining indices and recurrence in low-grade astrocytomas. **Brain Tumor Pathol.**, v.14, p.47-51, 1997.

HOSHINO, T.; WILSON, C.B. Cell kinetic analyses of human malignant brain tumors (gliomas). **Cancer**, New York, v.44, p.956-962, 1979.

ISHII, N. et al. Absence of p53 gene mutation in a tumor panel representative of pilocytic astrocytoma diversity using a p53 functional assay. **Int. J. Cancer**, New York, 76, p.797-800, 1998.

ISOBE, M. et al. Localization of gene for human p53 tumor antigen to band 17p13. **Nature**, London, v.320, p.84-85, 1986.

ISOLAN, G.R. Medicina baseada em evidências: o novo paradigma da prática médica. **Rev. Méd. Res. HUEC**, Curitiba, v. 3, p.22-26, 2001.

JAROS, E. et al. Prognostic implications of p53 protein, epidermal growth factor receptor, and Ki-67 labelling in brain tumors. **Br. J. Cancer**, Edinburgh, v.66, p.373-385, 1992.

JEKEL, J.F.; ELMORE, J.G.; KATZ, D.L. **Epidemiologia bioestatística e medicina preventiva**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999.

KAULISCH et al. Genetic alterations commonly found in diffusely infiltrating cerebral gliomas are rare or absent in pleomorphic xanthoastrocytomas. **Neuropathol. Exp. Neurol.**, v.61, p.1092-109, 2002.

KAUSCH, K. et al. Anti-sense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo. **Int. J. Cancer** 105(5), 2003.

KAYASELCUK, F. et al. PCNA and Ki-67 in central nervous system tumors: correlation with the histological type and grade. **J. Neurooncol.**, Dordrecht, v.57, p.115-121, 2002.

KEPES, J.J.; RUBINSTEIN, L.J.; CHIANG, H. The role of astrocytes in the formation of cartilage in gliomas. An immunohistochemical study of four cases. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v.117, p.471-483, 1984.

KHOSHYOMN, S et al. Brain tumor invasion rate measured in vitro does not correlate with Ki-67 expression. **J. Neurooncol.**, Dordrecht, v.45, p.111-116, 1999.

KILL, J.R. Localization of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillary in deficient region of the dense fibrillar component. **J. Cell Sci.**, Cambridge, v.109, p.1253-1263, 1996.

KIM, et al. Correlates of survival and the Daumas-Duport grading system for astrocytomas. **J. Neurosurg.**, Baltimore, v.74, p.27-37, 1991.

KLEIHUES, P.; BURGER, P.C.; SCHEITHAUER, B.W. The new WHO classification of brain tumors. **Brain Pathol.**, Zurich, v.3, p.255-268, 1993.

KLEIHUES, P.; CAVENEE, W.K., EDS. **Pathology & genetics of tumours of the nervous system**: World Health Organization classification of tumors. Lyon: LARC Press, 2000.

KORDEC, R. et al. Comparative evaluation of p53-protein expression and the PCNA and Ki-67 proliferating cell indices in human astrocytomas. **Pathol. Res. Pract.**, Stuttgart, v.192, p.205-209, 1996.

KORSHUNOV, A.; GOLANOV, A.; SYCHEVA, R. Immunohistochemical markers for prognosis of anaplastic astrocytomas. **J. Neurooncol.**, Dordrecht, v.58, p.203-215, 2002.

KOSEL, S.; SCHEITHAUER, B.W.; GRAEBER, M.B. Genotype-phenotype correlation in gemistocytic astrocytomas. **Neurosurgery**, Baltimore, v. 48, p.187-193, 2001.

KROUWER, H.G. et al. Gemistocytic astrocytoma: a reappraisal. **J. Neurosurg.**, Baltimore, v.74, p.399-406, 1991.

KURTKAIA-YAPICIER, Ö et al. p53 in nonneoplastic central nervous system lesions: an immunohistochemical and genetic sequencing study. **Neurosurgery**, Baltimore, v.51, p.1246-1255, 2002.

LANDIS, S.H. et al. Cancer statistics, 1999. CA. **Cancer J. Clin.**, v. 49, p.8-31, 1999.

LANE, D.P. Cancer p53, guardian of the genome. **Nature**, London, v.358, p.15-16, 1992.

LANG, F.F. et al. Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. **J. Neurosurg.**, Baltimore, v. 81, p.427-436, 1994.

LANG, F.F. et al. High frequency of p53 protein accumulation without gene mutation in human juvenile pilocytic, low grade and anaplastic astrocytomas. **Oncogene**, London, v.9, p.949-954, 1994.

LANG, F.F. et al. Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: biological and clinical results. **J. Clin. Oncol.**, Philadelphia, v. 21, p.2508-2518, 2004.

LITOFISKY, N.S.; HINTON, D.; RAFFEL, C. The lack of a role p53 in astrocytomas in pediatric patients. **Neurosurgery**, Baltimore, v.34, p.967-973, 1994.

LITOFISKY, N.S. et al. Ki-67 (clone MIB-1) proliferation index in recurrent glial neoplasms: no prognostic significance. **Surg. Neurol.**, New York, v.50, p.579-585, 1998.



LITOFISKY, N.S.; RECHT, L.D. The impact of p53 tumor suppressor gene on glioma biology. **Neurosurg. Focus**, v.3, artigo 4, 1997. Disponível em <<http://www.neurosurgery.org/focus/sept97/3-3-4.html>>. Acesso em 01 mar. 2003.

LOPEZ, F. et al. Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. **Cytometry**, New York, v.12, p.42-49, 1991.

LOUIS, D.N. et al. Comparative study of p53 gene and protein alterations in human astrocytomas. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, Lawrence, v.52, p.31-38, 1993.

LOUIS, D.N.; CAVENEE, W.K. **Molecular biology of central nervous system tumors**. Disponível em: <<http://brain.mgh.harvard.edu/moleculargenetics.htm>> Acesso em: 01 mar. 2003.

McKEEVER, P.E. et al. MIB-1 proliferation index predicts survival among with grau II astrocytoma. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, Lawrence, v.57, p.931-936, 1998.

MARTINS, C.M. et al. **Índice de astrócitos gemistocíticos e imuno-expressão da proteína P53 em astrocitomas, grau II e III OMS**. Disponível em: <<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci>> Acesso em: 03 de mar. 2003.

MATHEWS, T.; MOOSSY, J. Gliomas containing bone and cartilage. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, Lawrence, v.33, p.456-471, 1974.

MATSUMOTO, T. et al. MIB-1 and p53 immunocytochemistry for differentiating pilocytic astrocytomas and astrocytomas from anaplastic astrocytomas and glioblastomas in children and young adults. **Histopathology** 33(5): 446-52, 1998.

MAY, P.; MAY, E. Twenty years of p53 research: structural and functions aspects of the protein. **Oncogene**, London, v.18, p.7621-738, 1999.

MICHALIDES, R.J. Cell cycle regulators: mechanism and their role in etiology, prognosis, and treatment of cancer. **J. Clin. Pathol.**, London, v.52, p.555-568, 1999. Disponível em: <<http://gateway2.ovid.com/ovidweb.cgi>> Acesso em: 22 de out. 2003.

MILLER, C. et al. Human p53 gene localized to short arm of chromosome 17. **Nature**, London, v.319, p.783-784, 1986.

MILNER, J. Structures and functions of the tumor suppressor p53. **Pathol. Biol.**, Paris, v.45, p.797-803, 1997.

MILNER, J.; MEDCALF, E.A. Cotranslation of activated p53 with wild-type p53 protein into the mutant conformation. **Cell**, Cambridge, 65, p.765-774, 1991.

MIRACO, C. et al. In situ detection of telomeres by fluorescence in situ hybridiz and telomerase activity in glioblastoma multiforme: correlation with p53 status, EGFR, c-myc, MIB1, and topoisomerase IIa protein expression. **Int. J. Oncol.**, Athens, v.23, p.1529-1535, 2003.

MIYASHITA, T. et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression *in vitro* and *in vivo*. **Oncogene**, London, v.9, p.1799-1805, 1994.

MOLL, U.M.; SCHRAMM, L.M. p53 – an acrobat in tumorigenesis. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, Alexandria, v.9, p.23-37, 1998.

MONTINE, T.J., et al. Prognostic significance of Ki-67 proliferation index in supratentorial fibrillary astrocytic neoplasms. **Neurosurgery**, Baltimore, v.34, p.674-679, 1994.

MOTTA, V.T.; WAGNER, N.B. **Bioestatística**. Caxias do Sul: Educs, 2003.

MUNOZ, E.L. et al. Proliferative activity and p53 mutation as prognostic indicators in pleomorphic xanthoastrocytoma. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, Lawrence, v.55, p.606, 1996.

NELSON, J.S.; TSUKADA, Y.; SCHOENFELD, D. Necrosis as a prognostic criterion in malignant supratentorial astrocytic gliomas. **Cancer**, New York, v. 52, p.550-554, 1983.

NEWCOMB, E.W. et al. A correlative study of p53 protein alteration and p53 gene mutation in glioblastoma multiforme. **Brain Pathol.**, Zurich, v.3, p.229-235, 1993.

PATT, S. et al. p53 gene mutations in human astrocytic brain tumors including pilocytic astrocytomas. **Human Pathol.**, Philadelphia, v.27, p.586-589, 1996.

PAULUS, W. et al. Molecular genetic alterations in pleomorphic xanthoastrocytoma. **Acta Neuropathol.**, Berlin, v.91, p.293-297, 1996.

PERRY, A. et al. Clinicopathologic study of 85 similarly treated patients with anaplastic astrocytic tumors. An analysis of DNA content (ploidy), cellular proliferation, and p53 expression. **Cancer**, New York, v.86, p.672-683, 1999.

PICKSLEY, S.M.; LANE, D.P. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop: a paradigm for the regulation of growth control by p53? **Bioessays**, Cambridge, v.15, p.689-690, 1993.

POLLACK, I.F. et al. The relationship between TP53 mutation and overexpression of p53 and prognosis in malignant gliomas of childhood. **Cancer Res.**, Baltimore, v.57, p. 304-309, 1997.

POLLACK, I.F. et al. Age and TP53 mutation frequency in childhood malignant gliomas: results in a multi-institutional cohort. **Cancer Res.**, Baltimore, v.61, p. 7404-7407, 2001.

PRAYSON, R.A.; ESTES, M.L. MIB-1 and p53 immunoactivity in protoplasmic astrocytomas. **Pathol. Int.**, v.46, p.1862-1866, 1996.

PROSPERI, E. Multiple roles of the proliferating cell nuclear antigen: DNA replication, repair and cell cycle control. **Prog. Cell Cycle Res.**, New York, v.3, p.193-210, 1997.

RALTE, A.M. et al. Clinicopathological features, MIB-1 labeling index and apoptotic index in recurrent astrocytic tumors. **Pathol. Oncol. Res.**, Budapest, v.7, p.267-278, 2001.

RANUNCULO, S.M. et al. Prognostic value of mdm2, p53 and p16 in patients with astrocytomas. **J. Neurooncol.**, Dordrecht, v.68, p.13-121, 2004.

REAVEY-CANTWELL J.F. et al. The prognostic value of tumors markers in patients with glioblastoma multiforme: analysis of 32 patients and review of the literature. **J. Neurooncol.**, Dordrecht, v.55, p.95-204, 2001.

REIFENBERGER, G. et al. Amplification and overexpression of the mdm2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. **Cancer Res.**, Baltimore, v.53, p.2736-2739, 1993.

RUBIO, M.P. et al. Accumulation of wild type of p53 protein in human astrocytomas. **Cancer Res.**, Baltimore, v.53, p.3465-3467, 1993.

SARKAR, C. et al. Recurrent astrocytic tumors – a study of p53 immunoreactivity and malignant progression. **Br. J. Neurosurg.**, Abingdon, v.16, p.335-342, 2002.

SARKAR, C. et al. Loss of heterozygosity of a locus in the chromosomal region 17p13.3 is associated with increased cell proliferation in astrocytic tumors. **Cancer Genet. Cytogenet.**, New York, v.144, p.56-64, 2003.

SCHIFFER, D. et al. Prognostic value of histologic factors in adult cerebral astrocytoma. **Cancer**, New York, v.61, p.386-393, 1988.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J. Cell Physiol.**, New York, v.182, p.311-322, 2000.

SHEER, C.J. Cancer cell cycles. **Science**, Washington, v.274, p.1672-1677, 1996.

SHIELDS, P.G.; HARRIS, C.C. Molecular epidemiology and the genetics of environmental cancer, **JAMA**, Chicago, v.266, p.681-687, 1991.

SHIRAISHI, S. Influence of p53 mutations on prognosis of patients with glioblastoma. **Cancer**, New York, v.95, p.249-257, 2002.

SIMMONS, et al. Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. **Cancer Res.**, Baltimore, v.61, p.1122-1128, 2001.

SINDRANSKY, D. et al. Clonal expansion of p53 cells is associated with brain tumor progression. **Nature**, London, v.355, p.846-847, 1992.

SOUSSI, T.; FROMENTEL, C.C.; MAY, P. Structural aspects of p53 protein in relation to gene evolution. **Oncogene**, London, v.5, p.945-952, 1990.

SPENCER, M. **Fundamentals of light microscopy**. Cambridge: University Press, 1982.

STARBORG, M. et al. The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression. **J. Cell Sci.**, Cambridge, v.109, p.43-153, 1996.

STARK, A.M. et al. Age-related expression of p53, Mdm-2, EGFR and Msh2 in glioblastoma multiforme. **Zentralbl. Neurochir.**, Leipzig, v.64, p.30-36, 2003.

STEILEN-GIMBEL, H. et al. Genetic heterogeneity in human astrocytomas: spatial distribution of p16 and tp53 deletions in biopsies. **Cancer Genet. Cytogenet.**, New York, v.113, p.115-119, 1999.

TATTER, S.B. **The new WHO classification of tumors affecting the central nervous system.** Disponível em <http://neurosurgery.mgh.harvard.edu/newwhobt.htm> Acesso em: 03 mar. 2003.

THOMPSON, M.W.; McINNES, R.R.; WILLARD, F.F. Genética do câncer. In: \_\_\_\_\_. **Thompson & Thompson genética médica.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

TIHAN, T. et al. Practical value of Ki-67 and p53 labelling indexes in stereotactic biopsies of diffuse and pilocytic astrocytomas. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Northfield, v.124, p.108-113, 2000.

TORP, S.T. Proliferative activity in human glioblastomas: evaluation of different Ki67 equivalent antibodies. **J. Clin. Pathol. Mol. Pathol.**, London, v.50, p.198-200, 1997.

TORP, S.T. Diagnostic and prognostic role of Ki-67 immunostaining in human astrocytomas using four different antibodies. **Clin. Neuropathol.**, Munich, v.21, p. 252-257, 2002.

TORP, S.T., ALSAKER, M. Ki-67 immunoreactivity, basic fibroblastic growth factor (bFGF) expression, and microvessel density as supplementary prognostic tools in low-grade astrocytomas. An immunohistochemical study with especial reference to the reliability of different Ki-67. **Pathol. Res. Pract.**, Stuttgart, v.198, p.261-265, 2002.

VAQUERO, J. et al. Prognostic significance of endothelial surface score and MIB-1 labeling index in glioblastoma. **J. Neurooncol.**, Dordrecht, v.46 p.11-16, 2000.

VAN DIERENDONCK, J.H. et al. Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. **Cancer Res.**, Baltimore, v.49, p.2999-3006, 1989.

VAN MEIR, E.G. et al. Analysis of the p53 gene and its expression in human glioblastoma cells. **Cancer Res.**, Baltimore, v.54, p.649-652, 1994.

VAN MEYEL, D.J. et al. p53 mutations, expression, and DNA ploidy in evolving gliomas: evidence for two pathways of progression. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v.86, p.1011-1017, 1994.

VAN OIJEN, M.G. et al. Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. **Am. J. Clin. Pathol.**, Chicago, v.110, p.24-31, 1998.

VITAL, A. et al. p53 protein expression in grade II astrocytomas: immunohistochemical study of 100 cases with long-term follow-up. **Pathol. Res. Pract.**, Stuttgart, v.194, p.831-836, 1998.

VON DEIMLING, A. et al. p53 mutations are associated with 17p allelic loss in grade II and grade III astrocytoma. **Cancer Res.**, Baltimore, v.52, p.2987-2990, 1992.

WAGNER, A.J.; KOKONTIS, J.M.; HAY, M. Myc-mediated apoptosis requires wild-type p53 in a manner independent of cell cycle arrest and ability of p53 to induce p21 WAF1/CIP1. **Genes Dev.**, Cold Spring, v.8, p.2817-2830, 1994.

WAKIMOTO, H. et al. Prognostic significance of Ki-67 labeling indices obtained using MIB-1 monoclonal antibody in patients with supratentorial astrocytomas. **Cancer**, New York, v.77, p.373-378, 1996.

WALLIS, Y.L.; MACDONALD, F. Demystified... oncogenes. **Mol Pathol.**, London, v.52, p.55-63, 1999.

WATANABE, K. et al. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. **Brain Pathol.**, Zurich, v.6, p.217-224, 1996.

WATANABE, K. et al. Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patient with multiple biopsies. **Clin. Cancer Res.**, Denville, 3, p.523-530, 1997.

WATANABE, K. et al. Role of gemistocyte in astrocytoma progression. **Lab. Invest.**, Baltimore, v.76, p.277-284, 1997.

WESTER, K. et al. Paraffin section storage and immunohistochemistry. Effects of time, temperature, fixation, and retrieval protocol with emphasis on p53 protein and MIB-1 antigen. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, New York, v.8, p.61-70, 2000.

WU, X.; LEVINE, A.J. p53 and E2F-1 cooperate to mediate apoptosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.91, p.3602-3606, 1994.

XIONG, Y. et al. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. **Nature**, London, v.366, p.701-704, 1993.

YANG, H.J., et al. The significance of gemistocytes in astrocytomas. **Acta Neurochir.**, Wien, v.145, p.1097-103, 2003.

YONISH-ROUACH, E. A question of life or death: the p53 tumor suppressor gene. **Pathol. Biol.**, Paris, v.45, p.815-823, 1997.

ZHOU, X.P. et al. Germline mutations in p53 but not p16/CDKN2 or PTEN/MMAC1 tumor suppressor genes predispose to gliomas. The ANOCEF Group. Association des NeuroOncologues d'Expression Française. **Ann. Neurol.**, Boston, v.46, p.913-916, 1999.

ZUBER, P.; HAMOU, M.F.; DE TRIBOLET, N. Identification of proliferating cells in human gliomas using the monoclonal antibody Ki-67. **Neurosurgery**, Baltimore, v.22, p.364-368, 1988.

## ANEXO - CARTA DO COMITÊ DE ÉTICA

## APÊNDICE

TABELA 8 - PREDITORES DE p53 EM MODELO DE REGRESSÃO LOGÍSTICA (RL) (1997/2001)

Variável	Coeficiente da RL	Odds Ratio (IC 95%)	Valor – P
Constante	-0,46		
Ki-67 (1:s;0:n)	0,24	1,27 (0,18 a 8,84)	0,81
Grau(1:alto;0:baixo)	0,14	1,12 (0,22 a 6,16)	0,87
Sexo (1:m;0:f)	0,69	1,99 (0,5 a 7,92)	0,33
Idade<18anos (1:s ;0:n)	-8,3	0,00(0,00 a 1,37X10 <sup>25</sup> )	0,81

FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.

NOTA: Eventos, p53=13; n=47.

TABELA 9 - PREDITORES DE Ki-67 EM MODELO DE REGRESSÃO LOGÍSTICA (RL) (1997/2001)

Variável	Coeficiente da RL	OddsRatio(IC95%)	Valor – p
Constante	-1,44		
Ki-67 (1:s; 0:n)	0,49	1,64(0,22 a 12,02)	0,63
Grau (1:alto; 0:baixo)	1,55	4,72(0,82 a 27,27)	0,08
Sexo (1:m; 0:f)	0,39	1,47 (0,28 a 7,85)	0,65
Idade < 18 anos (1:s; 0:n)	-0,19	0,83(0,03 a 20,07)	0,91

FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.

NOTA: eventos, Ki-67=37; n=47.

TABELA 10 - RESULTADO DA DISTRIBUIÇÃO GERAL DOS DADOS COMPUTADOS

CASO	IDADE	SEXO	GRAU	VARIANTE	Ki-67	P53
1	62	M	I	Pilocítico	19/1000	1+
2	52	F	II	Fibrilar	5/1000	1+
3	52	M	IV	Fibrilar	83/1000	1+
4	50	F	IV	Fibrilar	82/1000	0
5	71	F	IV	Fibrilar	4/1000	0
6	51	M	IV	Fibrilar	12/1000	0
7	16	F	II	Fibrilar	8/1000	0
8	85	F	I	Pilocítico	0/1000	0
9	46	M	IV	Fibrilar	12/1000	1+
10	61	F	IV	Fibrilar	31/1000	0
11	20	F	IV	Fibrilar	312/1000	0
12	38	M	II	Fibrilar	0/1000	3+
13	78	M	II	Fibrilar	0/1000	0
14	47	F	III	Fibrilar	272/1000	1+
15	8	M	I	Pilocítico	0/1000	0
16	22	F	IV	Gemistocítico	0/1000	3+
17	25	M	II	Fibrilar	4/1000	0
18	21	F	IV	Fibrilar	126/1000	0
19	34	F	IV	Fibrilar	12/1000	0
20	45	M	IV	Gemistocítico	178/1000	3+
21	56	M	IV	Fibrilar	27/1000	1+
22	47	M	IV	Gemistocítico	111/1000	0
23	29	F	II	Fibrilar	5/1000	1+
24	39	F	II	Gemistocítico	9/1000	0
25	55	M	IV	Fibrilar	12/1000	1+
26	47	F	IV	Fibrilar	8/1000	0
27	26	F	III	Fibrilar	0/1000	0
28	45	M	II	Gemistocítico	2/1000	0
29	66	F	IV	Fibrilar	28/1000	1+
30	63	F	IV	Fibrilar	0/1000	0
31	59	M	IV	Fibrilar	256/1000	0
32	70	F	II	Fibrilar	0/1000	0
33	56	M	IV	Fibrilar	6/528	0
34	27	F	IV	Fibrilar	87/1000	1+
35	40	M	II	Fibrilar	0/1000	0
36	57	F	IV	Fibrilar	46/1000	0
37	61	M	II	Fibrilar	8/1000	0
38	62	M	IV	Fibrilar	98/1000	0
39	32	F	IV	Fibrilar	251/1000	0
40	58	M	IV	Fibrilar	58/1000	0
41	27	F	III	Fibrilar	42/1000	0
42	58	M	III	Fibrilar	423/1000	0
43	40	M	IV	Fibrilar	19/1000	0
44	34	F	II	Fibrilar	3/1000	0
45	48	M	IV	Gemistocítico	177/1000	4+
46	4	M	I	Pilocítico	0/1000	0
47	63	F	III	Fibrilar	26/1000	0

FONTE: HUEC – Dados trabalhados pelo autor.



